



LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Perbandingan Salep Kitosan Ekstrak Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) Dan Obat Topikal Komersial Yang Di Induksi Luka Bakar Derajat II Dalam pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Terhadap Ekspresi TGF- β dan Jumlah Sel Makrofag di Kulit

Oleh:
NOVEMBRIANTI HANDAYANI
145130101111052

Setelah dipertahankan didepan Majelis penguji
Pada tanggal 27 Agustus 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS

NIP. 19520412 198002 1 001

drh. Dahliatul Qosimah, Mkes.

NIP. 19820127 201504 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Novembrianti Handayani

NIM : 145130101111052

Program Studi : Pendidikan Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi Berjudul :

Perbandingan Salep Kitosan Ekstrak Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) dan Obat Topikal Komersial Yang Di Induksi Luka Bakar Derajat IIB Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Terhadap Ekspresi TGF-B dan Jumlah Sel Makrofag di Kulit.

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 27 Agustus 2018

Yang Menyatakan,

(Novembrianti Handayani)

NIM. 145130101111052

Perbandingan Salep Kitosan Ekstrak Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) Dan Obat Topikal Komersial Yang Di Induksi Luka Bakar Derajat II Dalam pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Terhadap Ekspresi TGF- β dan Jumlah Sel Makrofag di Kulit

ABSTRAK

Luka bakar adalah kerusakan jaringan permukaan tubuh disebabkan oleh panas pada suhu tinggi yang menimbulkan reaksi. Fase inflamasi merupakan fase awal penyembuhan luka, dimana makrofag yang berfungsi sebagai fagositosis jaringan mati. Makrofag akan menghasilkan TGF- β yang akan menginduksi proliferasi berbagai sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan antara pemberian salep kitosan dan obat topical komersial (*Neomycine sulfat dan ekstrak plasenta*) terhadap peningkatan ekspresi TGF- β dan jumlah makrofag. Penelitian ini bersifat eksperimental membandingkan dua kelompok perlakuan (diinduksi luka bakar dengan pemberian obat topical komersial untuk pemeriksaan TGF- β dengan metode imunohistokimia dan kelompok terapi (diinduksi luka bakar dengan pemberian terapi salep kitosan ekstrak cangkang rajungan konsentrasi 5% selama 1, 3, dan 7 hari). Perhitungan jumlah sel makrofag dengan cara pengamatan histopatologi kulit dan dianalisa secara deskriptif dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin dan ekspresi TGF- β dihitung menggunakan imunoratio dengan perbesaran mikroskop 400x. Analisa data dilakukan dengan uji t. Rata-rata ekspresi TGF- β pada hari ke-1, 3, 7 pada pemberian kitosan 5% yaitu 40.93, 41.29, 53.09 sedangkan pada obat topical komersial yaitu 37.91, 40.37, 54.59. Rata-rata jumlah makrofag pada pemberian kitosan 5% yaitu 4.37, 8.10, 5.45 sedangkan pada obat topical komersial yaitu 4.17, 6.92, 4.45. Hasil penelitian menunjukkan pemberian salep kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) tidak berbeda nyata dengan pemberian obat topical komersial terhadap peningkatan ekspresi TGF- β dan penurunan jumlah sel makrofag pada hari ke-1, 3 dan 7 ($p>0.05$). Kesimpulan dari penelitian ini salep kitosan dari ekstrak cangkang rajungan berpotensi dapat menyembuhkan luka bakar.

Kata kunci : Cangkang rajungan, Kitosan, Luka bakar, sel makrofag, TGF- β .

Comparison of Chitosan Ointment of Crabs (*Portunus pelagicus*) Shell Extract and Commercial Topical Medication Induced by Second Degree Burns in White Rat (*Rattus norvegicus*) on TGF- β Expression and Number of Macrophage Cells in the Skin

ABSTRACT

Burns are damage to the body's surface tissue caused by heat at high temperatures which causes a reaction. The inflammatory phase is the initial phase of wound healing where there are macrophages that function as dead tissue phagocytosis. Macrophages will produce TGF- β which will induce proliferation of various cells. This study aims to determine the comparison between the administration of chitosan ointment and topical commercial medications (Neomycine sulfate and placental extract) to increase TGF- β expression and the number of macrophages. This study was experimental in comparing two treatment groups (induced burns with commercial topical medication administration (Neomycine sulfate and placental extract) for TGF- β examination with Immunohistochemical methods and two treatment groups (burns induced by therapy of concentrated chitosan extract ointment 5% for 1, 3 and 7 days). Calculation of the number of macrophage cells by histopathological observation of the skin and analyzed descriptively with Hematoxylin-Eosin staining and TGF- β expression were calculated using immunoratio with 400x microscope magnification. Data analysis is done by t test. The average expressions on days 1, 3, 7 on 5% chitosan administration were 40.93, 41.29, 53.09 while in commercial topical medication were 37.91, 40.37, 54.59. The average numbers of macrophages in 5% chitosan were 4.37, 8.10, 5.45 while in commercial topical medication are 4.17, 6.92, 4.45. The results showed that chitosan ointment from crab shell (*Portunus pelagicus*) was not significantly different from commercial topical medication administration (Neomycine sulfate and placenta extract) to increase TGF- β expression and decrease in the number of macrophage cells on days 1, 3 and 7 ($p > 0.05$). The conclusion of this study is that chitosan ointment from extracts of crab shells has the potential to heal burns.

Keywords: Crab shells, Chitosan, Burns, Macrophage cells, TGF- β .

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Perbandingan Salep Kitosan Ekstrak Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) dan Obat Topikal Komersial yang di Induksi Luka Bakar pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) terhadap Ekspresi TGF- β dan Jumlah Sel Makrofag di Kulit”.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada pihak-pihak yang telah membantu secara langsung maupun tidak langsung dalam menyelesaikan skripsi ini, yaitu :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas motivasi yang diberikan kepada penulis.
2. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS sebagai dosen pembimbing pertama, yang telah bersedia membimbing dengan penuh kesabaran, memberikan nasihat, arahan, motivasi dan tambahan pengetahuan kepada penulis.
3. drh. Dahliatul Qosimah, Mkes sebagai dosen pembimbing kedua, atas dorongan semangat, bimbingan, nasihat, kesabaran, serta tambahan ilmu yang telah diberikan kepada penulis.
4. drh, M. Arfan Lesmana, M.Sc sebagai dosen penguji pertama, yang telah memberikan saran dan masukan untuk memperbaiki penelitian dan penulisan skripsi.

5. drh. Albiruni Haryo, M.Sc sebagai dosen penguji kedua, yang telah memberikan saran dan masukan untuk memperbaiki penelitian dan penulisan skripsi.
6. Orang tua Sara Rasdianah dan La Ode Faimu, Adik tercinta Ibnu Ramadhan, Mitslah Hasnul Atika, Rahmi Agista, Humna Umniyah Nafisah, Ovar yang selalu memberikan doa, dukungan, semangat dan motivasi yang tiada henti untuk penulis sehingga semuanya menjadi lancar dalam penelitian dan penulisan skripsi.
7. Rekan satu tim penelitian Nadila Dwi Ashlina., Annisa W., Garnis Retno S., dan Winda Hermin A., yang telah bekerja dan berjuang bersama dalam penelitian ini.
8. Teman sekaligus keluarga “Chelonia 2014 C” serta seluruh mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penulisan skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala kritik dan saran yang membangun. Akhirnya semoga tugas akhir sarjana ini dapat bermanfaat

Malang, 27 Agustus 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xii
BAB 1.PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2.TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kulit.....	7
2.1.1 Definisi Kulit.....	7
2.1.2 Histologi Kulit.....	8
2.2 Luka Bakar	10
2.2.1 Pengertian Luka Bakar.....	10
2.2.2 Etiologi Luka Bakar	11
2.2.3 Klasifikasi Luka Bakar.....	12
2.2.4 Proses Kesembuhan Luka	14
2.2.5 Transforming Growth Factor-Beta TGF- β	19
2.2.6 Sel Makrofag Pada Proses Kesembuhan Luka.....	21
2.3. Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>).....	22
2.3.1 Klasifikasi Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>).....	21
2.3.2 Morfologi Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>)	23
2.3.3 Kandungan Cangkang Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>).	26
2.3.4 Kitosan dan Manfaat Terhadap Luka	26
2.4. Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>).....	28
2.4.1 Klasifikasi.....	28
2.4.2 Anatomi Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>).....	29

BAB 3.KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori	31
3.2 Kerangka Konsep	34
3.2 Hipotesis	35

BAB 4.METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	36
4.2 Alat dan Bahan	36
4.3. Tahapan Penelitian	37
4.3.1 Rancangan Penelitian	37
4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian	38
4.3.3 Variabel Penelitian	38
4.4. Prosedur Kerja	38
4.4.1 Persiapan Hewan Coba.....	38
4.4.2 Prosedur Esktraksi Kitosan Cangkang Rajungan.....	39
4.4.3 Pembuatan Salep Kitosan Cangkang Rajungan.....	41
4.4.4 Pembuatan Luka Bakar Pada Tikus	41
4.4.5 Terapi Salep Kitosan Cangkang Rajungan	42
4.4.6 Pembuatan Preparat Histologi Kulit.....	43
4.4.7 Perhitungan Jumlah Sel Makrofag.....	44
4.4.8 Prosedur Imunohistokimia Ekspresi TGF- β	44
4.4.9 Analisa Data	46

BAB 5.HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Uji FTIR Ekstrak Kitosan dari Cangkang Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>)	47
5.2 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>) terhadap Gambaran Makroskopis pada Kulit Tikus Pasca Luka Bakar	48
5.3 Ekspresi TGF- β pada Luka Bakar.....	51
5.4 Efek Pemberian Salep Kitosan Ekstrak Cangkang Rajungan pada Tikus Putih Pasca Luka Bakar Derajat II dalam terhadap Jumlah Makrofag.....	55

BAB 6.KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan	62
6.2 Saran	62

DAFTAR PUSTAKA	63
-----------------------------	----

LAMPIRAN	67
-----------------------	----

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Data Jumlah Ekspresi TFG- β Kelompok Perlakuan Salep Kitosan dan Kelompok Kontrol Positif Hari ke-1, 3, dan 7	53
5.2 Data Jumlah Makrofag	57



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Struktur Lapisan Kulit.....	7
2.2 Histologi Kulit.....	8
2.3 Zona Luka Bakar.....	11
2.4 Anatomi Rajungan	24
2.5 Senyawa Kitin dan Kitosan.....	27
5.1 Gambaran Makroskopis Kulit Tikus Pasca Luka Bakar	50
5.2 Gambaran Mikroskopis Ekspresi TGF- β	53
5.3 Gambaran Mikroskopis Jumlah Sel Makrofag	57



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persentase
/	Per
APC	Antigen Presenting Cell
APRI	Asosiasi Pengolahan Rajungan Indonesia
BNF	<i>Buffer Natural Formaline</i>
CaCO ₃	Kalsium Karbonat
COX-2	Sikloksigenase-2
DAB	<i>Diamano Benzidine</i>
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor-2</i>
FK	Fakultas Kedokteran
FKH	Fakultas Kedokteran Hewan
g	Gram
g/dL	Gram per desiliter
HE	Hematoksilen-Eosin
HMW	Hight Molecule Weight
IHK	Imunohistokimia
IL-1	Interleukin-1
IL-4	Interleukin-4
KGF	<i>Keratinosit growth factor</i>
LMW	Low Molecule Weight
m ²	Meter kubik
mg/dL	Miligram per desiliter
MgCO ₃	Magensium Karbonat
mL	Mililiter
mm	Milimeter
mmHg	Milimeter Merkuri <i>Hydragyrum</i>
MMP	Matriks Metaloproteinase
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natrium Klorida
°C	Derajat Celcius
PAF	<i>Insulinlike growth factor-1</i>
PBS	<i>Phospat Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived growth factor</i>
PGE2	Prostaglandin E2

pH
PMN
SAHRP
TGF- β
TIMP
TNF
UB
VEGF

Potensial Hidrogen
Polimorfonuklear
Strep Avidin Horse Radish Peroxidine
Transforming growth factor β
Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
Tumor necrosis factor
Universitas Brawijaya
Vascular endotelial growth factor



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luka adalah hilang atau rusaknya sebagian jaringan tubuh yang menyebabkan gangguan kontinuitas, sehingga terjadi pemisahan struktur jaringan yang semula normal (Nazir, 2015). Luka merupakan suatu bentuk kerusakan jaringan pada kulit yang disebabkan kontak dengan sumber panas (seperti bahan kimia, air panas, api, dan listrik), hasil tindakan medis, maupun perubahan kondisi fisiologis. Luka menyebabkan gangguan pada fungsi dan struktur anatomi tubuh. Berdasarkan penyebabnya terdapat dua jenis luka yaitu luka tertutup dan luka terbuka. Luka terbuka yaitu luka yang terpapar oleh udara karena adanya kerusakan pada kulit, jenis luka terbuka yaitu luka bakar (Nagori and Solanki, 2011).

Luka bakar adalah kerusakan jaringan permukaan tubuh disebabkan oleh panas pada suhu tinggi yang menimbulkan reaksi. Jaringan yang mengalami perlukaan akan terjadi penyembuhan luka. Proses penyembuhan luka terdiri dari fase inflamasi, proliferasi, dan remodeling. Pada fase inflamasi diawali dengan migrasi neutrofil dari pembuluh darah ke jaringan luka. Neutrofil pada fase inflamasi berfungsi untuk memfagositosis jaringan mati dan mencegah terjadinya infeksi. Neutrofil akan mengeluarkan protease untuk mendegradasi matriks ekstraseluler yang tersisa. Neutrofil akan difagosit oleh sel inflamasi, yaitu makrofag. Fase proliferasi terhadap proses angiogenesis, pembentukan jaringan granulasi, dan migrasi sel epitel (Sabirin dkk., 2013). Fase remodeling merupakan fase terakhir dan terpanjang pada

penyembuhan luka. Terjadi proses dinamis berupa remodeling kolagen, kontraksi luka dan maturasi jaringan (Suriadi, 2004).

Dalam penyembuhan luka, banyak sekali faktor penyebab yang berperan, salah satunya adalah makrofag. Makrofag merupakan sel yang berperan pada fase inflamasi dan proliferasi. Makrofag sebagai sel fagosit yang berasal dari monosit dalam sirkulasi pembuluh darah. Makrofag sebagai sel yang memfagosit daerah luka dan membersihkan debris akan meningkat pada fase inflamasi dan akan menurun jumlahnya pada fase proliferasi ketika luka mulai menutup (Nurdiana, 2015).

Makrofag mensekresi sejumlah produk yang aktif secara biologik sesaat setelah diaktifkan (Jayadi dan Arum, 2015). Salah satu produk sekresi dari makrofag yaitu TGF- β berperan dalam kemotaksis dan mediator inflamasi. TGF- β berpartisipasi dalam kedua proses untuk merangsang respon imun awal sebagai sitokin proinflamasi, melalui perekrutan polimorfonuklear (PMN), dan membatasi terjadinya respon inflamasi sebagai sitokin antiinflamasi (Gilbert *et al.*, 2016).

Indonesia merupakan salah satu negara pengekspor produk olahan hasil perikanan. Salah satunya adalah hasil olahan dari rajungan (*Portunus pelagicus*). Menurut Asosiasi Pengolahan Rajungan Indonesia (APRI), total produksi rajungan Indonesia mencapai 30.000 ton/tahun, dan hasil produk ini sebagian besar untuk kebutuhan ekspor dalam bentuk kemasan kaleng yang menyisahkan limbah cangkang rajungan. Cangkang kulit rajungan mengandung kitin yang dapat dikonversi menjadi kitosan melalui reaksi deasetilasi. Sehingga limbah cangkang rajungan ini sangat berpotensi menjadi produk yang bernilai, yaitu kitosan (Sukma, 2014).

Kitosan merupakan polisakarida yang disusun dari glikosamin dengan ikatan glikosida. Kitosan dapat diperoleh melalui proses deasetilasi kitin dari cangkang kulit rajungan (*Portunus pelagicus*) (Sukma, 2014). Kitosan sebagai anti mikroba dengan cara berikatan dengan dinding sel mikroba dan membran sitoplasma, sehingga akan menurunkan stabilitas osmotik, gangguan membran, dan dapat menembus nukleus dari bakteri untuk menghambat sintesis mRNA dan protein dengan cara berikatan pada DNA mikroba. Kitosan sebagai anti inflamasi yaitu dengan mengurangi produksi COX-2 sehingga akan menekan peningkatan ekspresi sitokin pro inflamasi secara berlebihan seperti IL-4 dan akan menghambat PGE2 yang bekerja sebagai mediator inflamasi (Hanifah, 2015, Karakecili, *et al.*, 2008, dan Ratnawati, 2014). Kitosan sebagai haemostasis dengan menstimulus faktor pertumbuhan darah seperti protombin dan fibrinogen (Paul dan Sharma, 2004). Kitosan dapat mensekresi sitokin seperti TGF- β selama proses penyembuhan luka (Anggraeni, 2012). Sifat-sifat kitosan tersebut dapat digunakan sebagai obat alternatif untuk mempercepat penyembuhan luka.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbandingan efek pemberian salep ekstrak cangkang rajungan dan obat topikal komersial terhadap proses penyembuhan luka bakar, dikaji dari jumlah sel makrofag serta ekspresi TGF- β yang membantu dalam mempercepat proses penyembuhan luka bakar.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Apakah terdapat perbedaan efek antara pemberian salep ekstrak cangkang rajungan dan obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan *ekstrak plasenta*) terhadap peningkatan ekspresi TGF- β pada luka bakar tikus putih (*Rattus norvegicus*) ?

1.2.2 Apakah terdapat perbedaan efek antara pemberian salep ekstrak cangkang rajungan dan obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan *ekstrak plasenta*) terhadap peningkatan jumlah sel makrofag pada luka bakar tikus putih (*Rattus norvegicus*) ?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) dewasa galur Wistar umur 2 – 3 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Penggunaan hewan coba sudah mendapatkan layak etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 942.
2. Cangkang rajungan yang digunakan adalah cangkang *Portunus pelagicus* dari pengolohan ranjungan di daerah Sampang, Madura. Klasifikasi rajungan yaitu, famili *Portunidae* dengan genus *Portnus*. Karapas rajungan berbentuk pipih dengan warna cerah putih kebiruan, gigi sebelah luar lebih besar dan lebih menonjol, lebarnya dapat mencapai 2/3 kali panjangnya.
3. Pembuatan luka bakar dilakukan melalui kontak langsung dengan agen termal berupa besi yang telah dimasukkan dalam air bersuhu 100°C selama 15 menit dan dilekatkan pada kulit selama 15 detik sehingga dihasilkan luka bakar

derajat tipe II dalam. Ditandai berwarna merah muda (masih ada beberapa aliran darah) dan putih (aliran darah sedikit atau tidak ada sama sekali) setelah terjadi cedera karena variasi suplay darah dermis.

4. Pembuatan salep ekstrak cangkang rajungan yang mengandung kitosan dengan cara deproteinasi, demineralisasi dan deasetilisasi. Pada pembuatan salep dilakukan dengan mencampurkan kitosan ekstrak cangkang rajungan dengan konsentrasi 5% (Putri, 2012), ke dalam dasar salep yang dibuat sediaan total sebanyak 14 gram.
5. Pemberian terapi salep kitosan ekstrak cangkang rajungan pada hewan model, langsung dilakukan setelah terjadi luka bakar dan diberikan salep kitosan setiap hari dengan dosis pemberian 0,25 mg/kg.
6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi TGF- β dengan pewarnaan menggunakan imunohistokimia dan perhitungan menggunakan immunoratio serta jumlah sel makrofag dengan preparat histopatologi kulit dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) pada perbesaran 400x.
7. Obat topikal komersial (*Neomycin sulfat dan ekstrak plasenta*) yang mengandung *Placenta extract* 10% dan *Neomycin sulfate* 0,5 % dengan sediaan gel yang diberikan pada hewan model luka bakar secara topical.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui perbedaan antara efek pemberian salep ekstrak cangkang rajungan dan obat topikal komersial (*Neomycin sulfat dan ekstrak plasenta*) terhadap peningkatan ekspresi TGF- β pada hewan model luka bakar tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Mengetahui perbedaan antara efek pemberian salep ekstrak cangkang rajungan dan obat topikal komersial (*Neomycin sulfat dan ekstrak plasenta*) terhadap peningkatan jumlah sel makrofag pada hewan model luka bakar tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.5 Manfaat penelitian

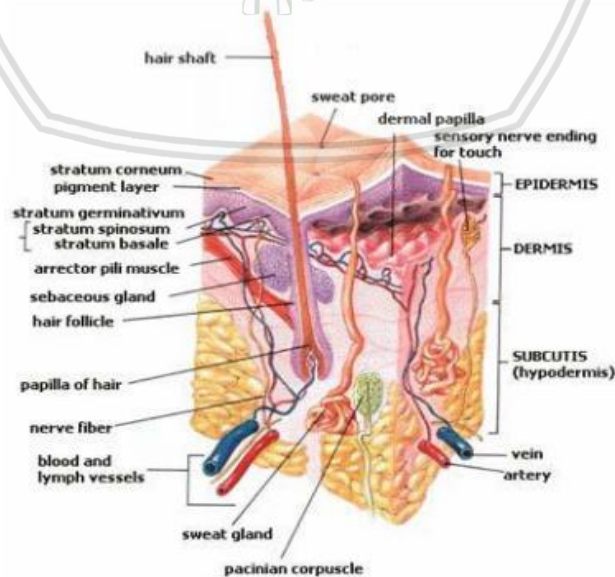
1. Memperoleh dasar informasi potensi sintesis kitosan hasil dari cangkang rajungan sebagai alternatif dari luka bakar.
2. Memberi nilai tambah pada limbah cangkang rajungan.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit

2.1.1 Definisi Kulit

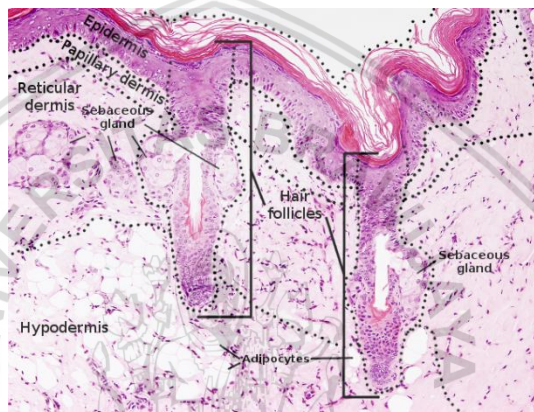
Kulit merupakan organ tersebar dari tubuh yang berfungsi sebagai pertahanan pertama terhadap mikroorganisme, bahan kimia, dan radiasi, selain itu juga berfungsi sebagai reseptor sensorik terhadap sentuhan, tekanan, nyeri, temperatur (panas dan dingin), dapat mengubah pro vitamin D menjadi vitamin D dengan bantuan sinar matahari, penyimpanan air, lemak, protein, dan karbohidrat (Pavletic, 2010). Kulit secara embriologis berasal dari dua lapisan, yaitu lapisan luar adalah epidermis yang merupakan epitel berasal dari ektoderm, sedangkan lapisan dalam berasal dari mesoderm yaitu dermis atau korium yang merupakan jaringan ikat terlihat pada **Gambar 2.1** (Perdanakusuma, 2007).



Gambar 2.1 Struktur Lapisan Kulit Manusia (Goeser, 2008).

2.1.2 Histologi kulit

Menurut Mescher (2014) gambaran histologi kulit (Gambar 2.2) dan penjelasan dari masing-masing bagian kulit adalah sebagai berikut :



Gambar 2.2 Histopatologi Kulit (Mescher, 2010).

a. Epidermis

Epidermis terbentuk dari sel epitel gepeng berlapis, bertanduk (keratin), namun ada juga sel-sel lain yang terdapat di epidermis dalam jumlah yang lebih sedikit yaitu melanosit, sel markel dan langerhans. Biasanya lapisan kulit dibedakan menjadi kulit tebal (licin, tidak berambut) dan kulit tipis (berambut) (Junqueira, 2007).

Epidermis memiliki lima lapisan yaitu dari lapisan terluar sampai ke dalam adalah *stratum korneum*, *stratum lusidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum*, dan *stratum basal* atau *stratum germinativum*. Epidermis berfungsi sebagai proteksi barier, organisasi sel, sintesis vitamin

D dan sitokin, pembelahan dan mobilisasi sel, sebagai pigmentasi (melanosit) dan pengenalan alergen (sel langerhans) (Perdanakusuma, 2007).

b. Dermis

Dermis terdiri dari dua lapisan dengan batas yang tidak terlalu nyata yaitu *stratum papilare* bagian luar dan *stratum retikular* bagian dalam. Berikut penjelasan dari kedua lapisan tersebut :

Lapisan papiler terdiri dari jaringan ikat longgar, fibroblas, dan sel jaringan ikat lain seperti sel mast dan makrofag. Lapisan ini memiliki serabut kolagen yang berada didalam lamina basalis dan menyebar ke dalam dermis. Serabut kolagen memiliki fungsi untuk mengikat dermis pada epidermis sehingga disebut sebagai serabut penambat. Lapisan retikuler terdiri dari jaringan ikat teratur (terutama srabut kolagen tipe I), memiliki lebih banyak serat, dan lebih sedikit sel dari pada lapisan papiler (Junqueira and Carneiro, 2007).

Lapisan demis di bawah lapisan basal terdapat ujung saraf peraba, dan pembuluh darah kapiler. Di sini juga dapat ditemukan kelenjar keringat dan kelenjar minyak kulit. Kulit yang mengalami kerusakan mudah mengalami regenerasi atau perbaikan, tetapi jika kerusakan lebih dalam dari lapisan dermis, biasanya tempat yang rusak akan diisi oleh jaringan ikat (Wibowo, 2008).

c. Subkutis atau Hipodermis

Subkutis merupakan lapisan di bawah dermis atau hipodermis yang terdiri dari lapisan lemak, jaringan ikat yang menghubungkan kulit dengan jaringan di bawah. Subkutis memiliki jumlah dan ukuran yang berbeda-beda berdasarkan daerah di tubuh dan kualitas nutrisi setiap individu. Lapisan subkutis memiliki fungsi sebagai penunjang suplai darah ke dermis untuk regenerasi, untuk melekatkan kulit pada daerah di bawah, isolasi panas, sebagai cadangan kalori, mengontrol bentuk tubuh, serta sebagai *mechanical shock absorber* (Perdanakusuma, 2007).

Salah satu penyusun lapisan subkutan pada tikus putih adalah *panniculus carnosus*. *Panniculus carnosus* merupakan kumpulan otot tipis pada lapisan subkutan hewan. *Panniculus carnosus* adalah komponen dari stratum. Fibrosum subkutan, yang dalam lapisan jaringan ikat dari hipodermis. Serat otot *panniculus carnosus* sangat tidak teratur dan cenderung berjalan melintang. *Panniculus carnosus* menembus dermis dan memungkinkan gerakan involunter pada kulit (Bacha, 2000).

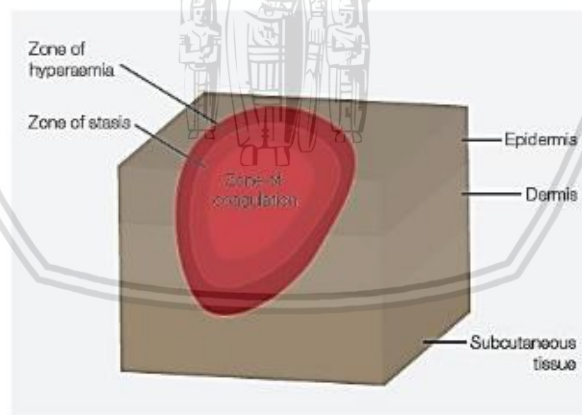
2.2 Luka Bakar

2.2.1 Pengertian Luka Bakar

Luka bakar adalah rusaknya sebagian jaringan tubuh yang disebabkan karena perubahan suhu yang tinggi, sengatan listrik, ledakan, maupun terkena bahan kimia (Smeltzer dan Bare, 2010). Luka bakar dapat terjadi pada kulit, selaput lendir, saluran pernapasan, dan saluran cerna. Gejalanya berupa sakit,

bengkak, merah, melepuh karena permeabilitas pembuluh darah meningkat (Hasyim dkk., 2012).

Luka bakar mengakibatkan tidak hanya kerusakan pada kulit, tetapi juga memengaruhi seluruh sistem tubuh. Pasien yang mengalami luka bakar luas (mayor) akan menyebabkan ketidakmampuan tubuh dalam mengkompensasi dan menyebabkan berbagai macam komplikasi sehingga memerlukan penanganan khusus (Moenadjat, 2003). Kulit dengan luka bakar akan mengalami kerusakan pada epidermis, dermis, maupun subkutan, sesuai faktor penyebab dan lama paparan kulit dengan sumber panas pada **Gambar 2.3**. Kedalaman luka bakar ditentukan oleh tingginya suhu dan lamanya paparan pada kulit (Syamsuhidayat dan Jong, 2005).



Gambar 2.3. Zona Luka Bakar (Rudall & Green, 2010)

2.2.2 Etiologi Luka Bakar

Penyebab luka bakar adalah adanya kontak dan paparan langsung dengan agen termal, kimiawi, listrik, dan radiasi (Betz, 2009). Luka bakar

dapat terjadi akibat adanya kontak dengan agen termal kering, seperti api dan logam panas, serta agen termal lembap seperti cairan atau gas panas. Luka bakar juga dapat disebabkan oleh kontak dengan agen kimiawi berupa asam, basa, dan muatan organik. Zat kimiawi tersebut dapat mengakibatkan perubahan fisik pada area luka yang terbakar (Grace dan Borley, 2007). Selain agen termal dan kimiawi, luka bakar juga dapat disebabkan kontak dengan objek konduktif dalam saluran listrik yang mengalami korsleting. Trauma listrik serius berasal dari aliran listrik yang melewati jalur organ, otot, dan saraf atau vaskular (Muscari, 2005). Radiasi juga dapat menyebabkan terjadinya luka bakar yang disebabkan oleh paparan sinar matahari, terapi medis, serta agen radiasi kuat lain. Pada tahap awal radiasi mengakibatkan luka bakar dengan kedalaman sebagian tetapi dapat berlanjut ketrauma yang lebih dalam (Grace dan Borley, 2007).

2.2.3 Klasifikasi luka

a. Luka Bakar Derajat I

Derajat I (*superficial*) hanya terjadi di permukaan kulit (epidermis). Manifestasinya berupa kulit tampak kemerahan, nyeri, dan mungkin dapat ditemukan bulla. Luka bakar derajat I biasanya sembuh dalam 3 hingga 6 hari dan tidak menimbulkan jaringan parut saat *remodeling* (Barbara *et al.*, 2013).

b. Luka Bakar Derajat II

Kerusakan terjadi pada seluruh lapisan epidermis dan sebagian lapisan dermis, berupa reaksi inflamasi disertai proses eksudasi. Dijumpai pula, pembentukan scar, dan nyeri karena ujung –ujung syaraf sensorik teriritasi. Dasar luka berwarna merah atau pucat. Sering terletak lebih tinggi diatas kulit normal (Moenadjat, 2009).

I. Derajat II Dangkal (*Superficial*)

Kerusakan mengenai bagian *superficial* dari dermis. Organ-organ kulit seperti folikel rambut, kelenjar keringat, kelenjar sebacea masih utuh. Bila mungkin tidak terbentuk beberapa jam setelah cedera, dan luka bakar pada mulanya tampak seperti luka bakar derajat I dan mungkin terdiagnosa sebagai derajat II *superficial* setelah 12-24 jam. Ketika bula dihilangkan, luka tampak berwarna merah muda dan basah. Jarang menyebabkan hypertrophic scar. Jika infeksi dicegah maka penyembuhan akan terjadi secara spontan kurang dari 3 minggu (Barbul, 2005).

II. Derajat II Dalam (*Deep*)

Kerusakan mengenai hampir seluruh bagian epidermis. Organ-organ kulit seperti folikel-folikel rambut, kelenjar keringat, kelenjar sebacea sebagian besar masih utuh. Gejala yang dimunculkan yaitu luka berwarna merah muda sampai merah terang, hingga putih, konsistensi lunak, adanya nyeri, kulit mengering, timbul bula dan terjadi edema (Marg *et al.*, 2013). Jika infeksi dicegah, luka bakar akan sembuh dalam 3 -9 minggu (Barbul, 2005).

III. Luka Bakar Derajat III (*Full Thickness burn*)

Kerusakan meliputi seluruh lapisan epidermis dan dermis dan lapisan lebih dalam seperti bagian fasia, otot, tendon dan tulang (Marg *et al.*, 2013). Apendises kulit seperti folikel rambut, kelenjar sebacea, kelenjar keringat mengalami kerusakan total. Luka mengakibatkan perubahan warna menjadi abu-abu, pucat, kering, namun biasanya tidak disertai bula.

Bentuk luka lebih dalam dibandingkan jaringan epidermis dan dermis, tidak adanya rasa nyeri karena serabut saraf sensorik mengalami kerusakan atau kematian. Contoh luka bakar derajat III yaitu tersengat arus listrik. Proses penyembuhan akan terjadi lebih lama dan membutuhkan pengobatan dari luar, hal ini karena tidak adanya reaksi spontan baik pada apendiseskulit, dasar luka maupun tepi luka (Frisca dkk., 2013).

2.2.4 Proses Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka adalah proses tubuh untuk memperbaiki kerusakan jaringan agar dapat berfungsi kembali. Tubuh berusaha untuk menormalkan kembali semua kondisi abnormal akibat luka dengan proses penyembuhan. Setelah terjadi luka, terjadi fase hemostatis merupakan mekanisme untuk menghentikan perdarahan yang terjadi akibat luka. Lalu terjadi fase inflamasi yang bertujuan untuk menghilangkan jaringan nonvial dan mencegah infeksi bakteri invasif. Kemudian, terjadi fase proliferasi dimana terjadi keseimbangan antara pembentukan jaringan parut dan

regenerasi jaringan. Pada fase yang terakhir, terjadi fase *remodelling* yang bertujuan untuk memaksimalkan kekuatan dan integritas struktural dari luka (Lorentz, 2006).

a. Fase Haemostatis

Luka dapat menyebabkan pendarahan, sehingga secara normal tubuh akan merespon untuk menghentikan perdarahan. Respon tersebut dilakukan dengan kontraksi otot polos dinding pembuluh darah (vasokonstriksi), sehingga dalam beberapa menit, aliran darah akan berkurang dimediasi oleh penyempitan arteriol akibat dari agregasi platelet yang menyebabkan hipoksia jaringan dan asidosis. Hal tersebut akan menyebabkan peningkatan produksi oksida nitrat, adenosin, dan metabolit vasoaktif yang menyebabkan refleksi vasodilatasi dan relaksasi pembuluh arteri, secara bersamaan histamin akan keluar dari sel mast untuk meningkatkan vasodilatasi dan permeabilitas pembuluh darah, sehingga akan memfasilitasi sel inflamasi masuk ke ruang ekstraseluler luka. Dalam fase ini trombosit memiliki peran penting untuk pembekuan darah sehingga darah yang keluar berkurang (Harper, 2014).

b. Fase Inflamasi

Fase inflamasi berlangsung sejak terjadinya luka sampai hari kelima, dan menjamin terjadinya homeostatis, penghilangan jaringan mati dan

mencegah terjadinya infeksi invasif oleh mikroba patogen jaringan yang rusak dan sel mast akan melepaskan histamin dan mediator lain, sehingga menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah sekeliling yang masih utuh, serta meningkatnya penyediaan darah ke daerah tersebut. Hal ini menyebabkan daerah di sekitar luka menjadi merah dan hangat. Permeabilitas kapiler darah meningkat dan cairan yang kaya akan protein mengalir ke dalam spasio interstisia, menyebabkan edema lokal (Morison, 2004).

Leukosit kemudian berpindah secara aktif dari sel endotel ke jaringan luka. Leukosit yang terdapat pada luka di dua hari pertama adalah neutrofil. Sel ini membuang jaringan mati dan bakteri dengan fagositosis. Neutrofil juga mengeluarkan protease untuk mendegradasi matriks ekstraseluler yang tersisa. Setelah melaksanakan fungsi fagositosis, neutrofil akan difagositosis oleh makrofag atau mati. Meskipun neutrofil memiliki peran dalam mencegah infeksi, keberadaan neutrofil yang persisten pada luka dapat menyebabkan luka sulit untuk mengalami proses penyembuhan. Hal ini bisa menyebabkan luka akut berprogresi menjadi luka kronis. Makrofag sebagai sel yang sangat penting dalam penyembuhan luka memiliki fungsi fagositosis bakteri dan jaringan mati. Makrofag mensekresi proteinase untuk mendegradasi *matriks ekstraseluler* (ECM) dan penting untuk membuang material asing, merangsang pergerakan sel, dan mengatur pergantian ECM. Makrofag merupakan penghasil sitokin dan *growth factor*

yang menstimulus proliferasi fibroblast, produksi kolagen, pembentukan pembuluh darah baru dan proses penyembuhan lainnya (Lawrence, 2002).

c. Fase Proliferasi

Fase proliferasi terjadi pada hari ketiga sampai keempat belas, apabila tidak terjadi infeksi atau kontaminasi maka fase inflamasi berlangsung pendek. Fase proliferasi ditandai dengan pembentukan jaringan granulasi. Fase proliferasi meliputi angiogenesis, pembentukan jaringan granulasi, deposisi kolagen, epitelisasi dan retraksi luka yang terjadi bersamaan (Triyono, 2005).

Proses angiogenesis dimulai dengan pelepasan faktor stimulus angiogenetik, sehingga akan menstimulus proliferasi sel endotel dan sel radang. Faktor tersebut memiliki target sel endotel yaitu *Vascular Endothelial Growth factor* (VEGF). *Vascular Endothelial Growth factor* memiliki peranan untuk meningkatkan proliferasi, migrasi sel endotel, dan membantu pembentukan struktur pembuluh darah (Frisca dkk, 2009).

Pembentukan jaringan granulasi dimulai dengan fibroblas distimulus untuk berkembang biak oleh faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh faktor pembekuan hemostatik dan kemudian bermigrasi ke luka. Pada hari ketiga, luka menjadi kaya fibroblas dan kemudian memproduksi kolagen dan fibronectin. Fibroblas akan memproduksi kolagen dalam jumlah besar

berupa glikoprotein berantai tripel (rangkap tiga). Kolagen tersebut merupakan unsur utama matriks ekstraseluler yang berfungsi untuk membentuk kekuatan pada jaringan perut. Selanjutnya akan terjadi proses deposisi kolagen yang pertama kali dideteksi pada hari ketiga setelah luka, meningkat sampai minggu ketiga, dan akan terus menumpuk sampai tiga bulan (Triyono, 2005).

Proses epitelisasi, dimulai dengan proses embriologikal yaitu sel epitel akan bergerak menyeberangi permukaan luka. Kemudian luka akan menutup, fase ini akan selesai setelah 24 jam. Proses retraksi luka terjadi pada hari ketujuh setelah luka, proses ini dimediasi oleh myofibroblas. Proses ini akan menyebabkan aktin dan myosin saling menarik tubuh dari sel untuk mengurangi luas area luka. Kontraksi tersebut dapat terjadi 0,75 mm per hari (Harper, 2014).

d. Fase *Remodelling*

Fase *remodelling* merupakan fase terakhir dalam penyembuhan luka yang terjadi dari hari ketujuh sampai dengan dua tahun. Pada fase ini akan didapatkan epitel yang normal dan maturasi jaringan yang luka. Fase ini dimulai dengan menyeimbangkan jumlah kolagen dan protein lain, sehingga akan membentuk kekuatan keregangan dari jaringan dan juga akan terjadi penurunan vaskularisasi, sehingga daerah yang luka berubah warna dari merah menjadi merah muda serta akan berwarna keabu-abu an sesuai dengan waktu yang dibutuhkan (Harper, 2014), sedangkan menurut

Gurtner (2007), fase *remodelling* jaringan ikat merupakan fase terlama dari proses penyembuhan luka. Fase ini dimulai pada hari ke-21 sampai satu tahun. Fase *remodelling* dimulai setelah kavitas luka terisi jaringan granulasi dan proses reepitelisasi selesai. Perubahan yang terjadi adalah penurunan kepadatan sel dan vaskularisasi, penghilangan matriks temporer yang berlebihan, serta penyusunan serat kolagen sepanjang luka untuk meningkatkan kekuatan regangan dari jaringan baru.

Fase *remodelling* secara rinci juga dijelaskan oleh Lawrence (2002) sebagai berikut pada fase ini terjadi keseimbangan antara proses sintesis dan degradasi kolagen. Kolagen yang berlebihan akan didegradasi oleh enzim kolagenase dan kemudian diserap, sehingga sisanya akan mengerut sesuai tegangan yang ada. Hasil akhir dari fase *remodelling* adalah jaringan ikat pucat, tipis dan mudah digerakkan dari dasarnya, sehingga pembentukan kolagen akan mulai menurun dan stabil, meskipun jumlah kolagen sudah maksimal tetapi kekuatan tahanan luka hanya 15% dibandingkan dengan kulit normal. Fase *remodelling* akan meningkat kekuatan tahanan luka secara dratis dengan cara mengganti kolagen tipe III menjadi kolagen tipe I, peningkatan tersebut terjadi pada minggu ketiga sampai minggu keenam setelah luka. Kekuatan tahanan luka yang maksimal akan mencapai 90% dari pada kulit normal.

2.2.5 Transforming Growth factor- Beta (TFG- β)

Transforming Growth factor- Beta (TGF- β) adalah sitokin polipeptida multifungsional yang disekresikan oleh berbagai sel dalam tubuh seperti platelet, *lymphocytes T*, makrofag, sel endotel, keratinosit, sel-sel otot polos, hepatosit, eosinofil, dan fibroblas. TGF- β memiliki sifat kemotaktik mirip dengan PDGF (*platelet derived growth factor*) dan limfosit. TGF- β juga memiliki efek mitogenik kuat pada makrofag, sel-sel otot polos, dan osteoblas. Seperti PDGF, TGF- β juga berperan dalam proses angiogenesis dan fibroplasia serta migrasi keratinosit. TGF- β juga dapat merangsang produksi *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase* (TIMP) sehingga dapat menghambat produksi MMP, proliferasi keratinosit, pertumbuhan sel endotel, limfosit, dan sel-sel epitel (Pavletic, 2010). Ekspresi TGF- β dipicu oleh adanya infeksi atau keadaan hipoksi dan iskemia jaringan atau sel (Kristianto, 2010).

Menurut Ester dan Troef (2012), TGF- β memiliki fungsi penting dalam proliferasi dan migrasi fibroblast, meningkatkan sintesis kolagen dan fibronectin serta mengurangi degradasi atau pemecahan matriks ekstraseluler oleh *metalloproteinase*. Peran TGF- β ini sangat penting dalam proses penyembuhan luka.

Peran TGF- β adalah sebagai faktor pertumbuhan yang memainkan peran penting pada proses perbaikan jaringan dan pembentukan jaringan parut. Bila sekresinya terhambat maka akan terbentuk jaringan parut yang meluas, yang dikenal dengan sebutan keloid (*scar*). Tetapi bila sekresinya meningkat maka kolagen sebagai unsur jaringan ikat pada penyembuhan luka akan turut

meningkat, sehingga luka akan sembuh lebih cepat dan lebih baik. TGF- β ini dapat terekspresi pada sel radang, fibroblast dan sel endotel dan intensitasnya bervariasi dari lemah hingga kuat (Ester dan Troef. 2012).

2.2.6 Sel Makrofag Pada Proses Kesembuhan Luka

Makrofag tersebar secara luas dalam tubuh hewan. Makrofag berperan dalam proses peradangan sebagai reaksi tubuh terhadap benda asing atau mikroba. Pada pertumbuhan neoplastik, makrofag ditemukan pada ruang ekstraseller (Fransisca, 2015). Proses penyembuhan luka pada fase inflamasi, jumlah makrofag mencapai puncaknya pada 24-48 jam setelah terjadi luka, fungsi makrofag adalah sebagai Antigen-presenting cell (APC) dan fagositosis (Suryadi, 2013). Inflamasi kemudian dimulai, karena monosit yang bersirkulasi cepat berdiferensiasi menjadi makrofag matang saat memasuki celah jaringan. Makrofag yang aktif atau makrofag pro-inflamasi (M1 makrofag) menghilangkan bakteri, benda asing, neutrofil yang mengalami apoptosis dan komponen jaringan yang rusak dari luka melalui fagositosis. Makrofag juga mengekspresikan berbagai mediator proinflammatory dan sitokin. Ketika proses inflamasi selesai dan makrofag berubah menjadi teraktivasi atau menjadi antiinflamasi. Makrofag antiinflamasi (M2 Makrofag) mengekspresikan berbagai mediator antiinflamasi, enzim protease dan protease inhibitor, serta *growth factor*. Fase remodeling mulai pada sekitar minggu ke 2-3 setelah

terjadinya luka dan granulasi jaringan berubah menjadi jaringan gores bekas luka (Pratama, 2017).

Peran makrofag ternyata tidak hanya terbatas pada fagositosis benda-benda asing yang masuk kedalam tubuh. Makrofag menjadi kunci pada proses fibrosis dan angiogenesis. Fibrosis penting agar jaringan dapat pulih dan bertahan terhadap lingkungan luar tubuh. Angiogenesis juga penting karena tanpa adanya pembuluh darah baru nutrisi tidak dapat diperoleh oleh jaringan sehingga jaringan akan mengalami kematian (Christina, 2015).

Menurut Marty (2013) Keberadaan sel makrofag dan neutrofil saling berhubungan dalam proses penyembuhan luka. Sel netrofil merupakan pertahanan seluler pertama yang jumlahnya meningkat pada awal pasca perlakuan. Sel neutrofil memfagositosis benda-benda asing seperti bakteri. Benda-benda asing yang tidak terfagositosis oleh netrofil akan diteruskan oleh makrofag yang mempunyai daya fagositosis lebih hebat dibandingkan dengan netrofil, bahkan mampu memfagosit 100 bakteri. Tingginya jumlah makrofag juga menunjukkan adanya fagositosis lebih banyak terhadap bakteri sehingga pembersihan luka berjalan lebih cepat.

2.3 Rajungan

2. 3. 1 Klasifikasi Rajungan

Rajungan adalah kepiting yang hidup di perairan laut dan jarang naik ke pantai. Ada dua jenis kepiting yang memiliki nilai komersil, yakni kepiting bakau dan rajungan. Di dunia, kepiting bakau terdiri atas 4 spesies dan

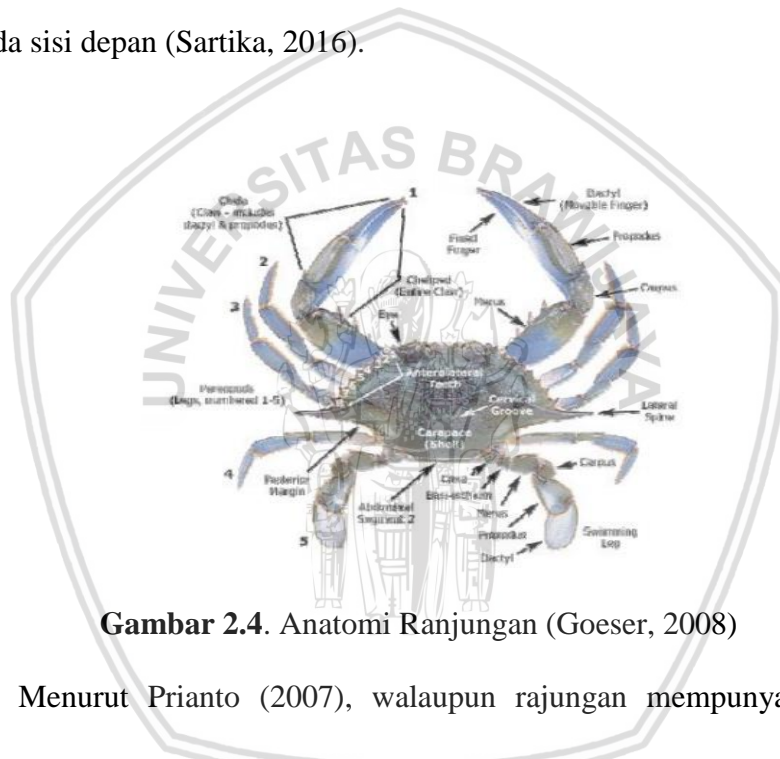
keempatnya ditemukan di Indonesia, yakni kepiting bakau merah (*Scylla olivacea*) atau di dunia internasional dikenal dengan nama red/orange mud crab, kepiting bakau hijau (*Scylla serrata*) yang dikenal sebagai giant mud crab karena ukurannya yang dapat mencapai 2-3 kg per ekor, *Scylla tranquebarica* (kepiting bakau ungu) juga dapat mencapai ukuran besar dan *Scylla paramamosain* (kepiting bakau putih) (Yanuar, 2013). *Portunus pelagicus* adalah spesies rajungan untuk budaya karena pertumbuhannya yang cepat, struktur anatomi yang menarik. *Portunus pelagicus* terdapat di perairan pantai dan muara dangkal, tropis dan pada daerah di seluruh Indo-Pasifik Barat dari Afrika ke India, Asia Tenggara dan Australia (Ravi, 2013).

Klasifikasi rajungan menurut Kangas (2000) adalah sebagai berikut :

Filum	: Crustacea
Kelas	: Malacostraca
Subkelas	: Arthropoda
Ordo	: Decapoda
Subordo	: Pleocyemata
Infraordo	: Brachyura
Famili	: Portunidae
Genus	: Portunus
Spesies	: <i>Portunus pelagicus</i>

2. 3. 2 Morfologi Rajungan (*Portunus pelagicus*)

Morfologi Rajungan dapat dilihat pada **Gambar 2.4**. Suku Portunidae mempunyai karapas atau cangkang lebar, lebarnya dapat mencapai $\frac{2}{3}$ kali panjangnya. Dahi bergigi empat buah, gigi sebelah luar lebih besar dan lebih menonjol, gigi ini lebih rendah dan lebih membulat pada individu yang belum dewasa. Capit memanjang, kokoh, mempunyai duri sebanyak 9, 6, 5, atau 4 pada sisi depan (Sartika, 2016).



Gambar 2.4. Anatomi Rajungan (Goeser, 2008)

Menurut Prianto (2007), walaupun rajungan mempunyai bentuk dan ukuran yang beragam tetapi seluruhnya mempunyai kesamaan pada bentuk tubuh. *Chelipeds* terletak di depan kaki pertama dan setiap jenis memiliki struktur *chelipeds* yang berbeda-beda. *Chelipeds* dapat digunakan untuk memegang dan membawa makanan, menggali, membuka kulit kerang dan juga sebagai senjata dalam menghadapi musuh. Karapas merupakan kulit yang keras atau dengan istilah lain exoskeleton (kulit luar) berfungsi untuk melindungi organ bagian kepala, badan dan insang.

Mulut rajungan terbuka dan terletak pada bagian bawah tubuh. Beberapa bagian yang terdapat di sekitar mulut berfungsi memegang makanan dan juga memompakan air dari mulut ke insang. Rajungan memiliki rangka luar yang keras sehingga mulutnya tidak dapat dibuka lebar. Menurut Juwana dan Kasijan (2000), rajungan dan kepiting sebenarnya satu famili atau satu suku. Karapasnya mempunyai pinggiran samping depan yang bergerigi dan jumlah giginya sembilan buah. Perutnya atau yang biasa disebut abdomen terlipat ke depan di bawah karapas. Abdomen jantan sempit dan meruncing ke depan. Abdomen betina melebar dan membulat penuh dengan embelan, gunanya untuk menyimpan telur.

Kepiting menemukan makanannya menggunakan rangsangan bahan kimia yang dihasilkan oleh organ tubuh. Antena memiliki indera penciuman yang mampu merangsang kepiting untuk mencari makan. Ketika alat pendeteksi pada kaki melakukan kontak langsung dengan makanan, *Chelipeds* dengan cepat menjepit makanan tersebut dan langsung dimasukkan ke dalam mulut. Mulut kepiting juga memiliki alat penerima sinyal yang sangat sensitif untuk mendeteksi bahan-bahan kimia. Kepiting mengandalkan kombinasi organ perasa untuk menemukan makanan, pasangan dan menyelamatkan diri dari predator (Prianto, 2007).

Kepiting termasuk dalam beberapa suku (familia), Portunidae dan sectio Brachyura. Rajungan (*Portunus pelagis*) sering berganti kulit secara teratur. Kulit kerangka tubuhnya terbuat dari bahan berkapur dan karenanya tak dapat

terus tumbuh. Jika ia akan tumbuh lebih besar maka kulitnya akan retak pecah dan dari situ akan keluar individu yang lebih besar dengan kulit yang masih lunak. Rajungan yang baru berganti kulit, tubuhnya masih sangat lunak. Masa selama bertubuh lunak ini merupakan masa yang sangat rawan dalam kehidupannya, karena pertahanannya pun sangat lemah. (Juwana, 2000).

2.3.3 Kandungan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*)

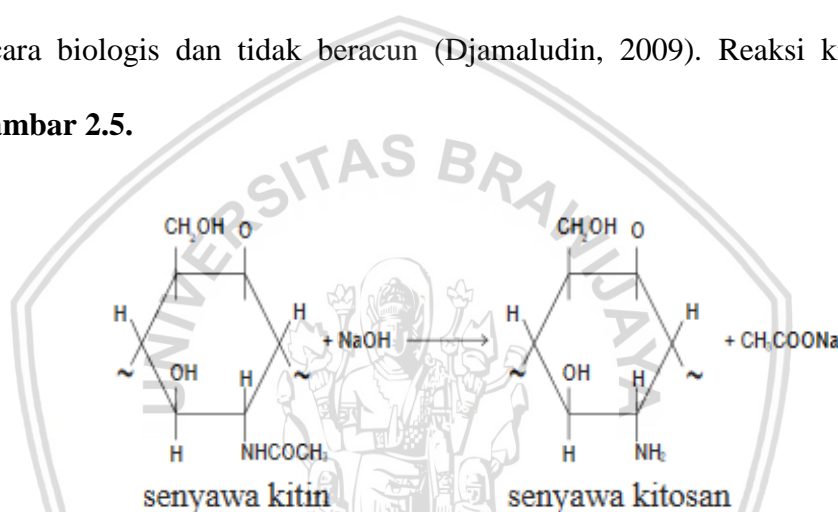
Menurut Muskar (2007) menyatakan bahwa cangkang rajungan diekspor dalam bentuk kering sebagai sumber kitin, kitosan dan karotenoid yang dimanfaatkan oleh berbagai industri sebagai bahan baku obat, kosmetik, pangan dan lain-lain. Bahan-bahan tersebut memegang peranan sebagai anti virus, anti bakteri dan digunakan juga sebagai obat untuk meringankan dan mengobati luka bakar. Selain itu cangkang rajungan dapat juga digunakan sebagai bahan pengawet makanan yang murah dan aman seperti kitosan. Kandungan gizi tepung cangkang rajungan dalam persen yaitu kadar air 4,45 , kadar abu 55,21 , kadar lemak 0,54 , kadar protein 13,58 , kadar kalsium 24,78 , kadar fosfor 0,49 (BBPMHP,2000).

2.3.4 Kitosan dan Manfaat terhadap Luka

Kitosan merupakan polisakarida yang disusun dari glukosamin dan N-asetilglukosamin yang diperoleh dari turunan kitin melalui reaksi deasetilasi, yang diekstraksi dari serbuk cangkang crustacea yang merupakan komponen

terbesar dari kitosan. Kitosan tidak berbau, berupa serbuk atau serpihan berwarna putih atau krem (Rowe dkk., 2009). Sifat kitosan tidak dapat larut dalam air atau larutan alkali diatas pH 6,5. Kitosan larut dengan cepat dalam asam organik cair seperti asam formmiat, asam sitrat, dan mineral lain, kecuali sulfur. Kitosan aman bagi lingkungan karena dapat mengalami degradasi secara biologis dan tidak beracun (Djamaludin, 2009). Reaksi kimia pada

Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Senyawa Kitin dan Kitosan (Hargono, 2008).

Kitosan memiliki empat fungsi dalam proses penyembuhan luka yaitu sebagai haemostasis dengan cara mempercepat proses pembekuan darah dengan menstimulus faktor pembekuan darah seperti protrombin dan fibrinogen, sehingga mengurangi darah yang keluar, sebagai anti inflamasi yaitu dengan mengurangi produk COX-2 sehingga akan menekan peningkatan ekspresi sitokin pro inflamasi secara berlebihann seperti IL-4 dan akan menghambat PGE_2 yang bekerja sebagai mediator inflamasi, dengan penurunan produksi enzim COX-2 dan PGE_2 maka akan mempercepat proses inflamasi, dan sebagai anti mikroba dengan cara berikatan dengan dinding sel

mikroba dan membran sitoplasma, sehingga akan menurunkan stabilitas osmotik, gangguan membran, dan terutama menyebabkan kebocoran bagian intraseluler mikroba, serta kitosan dapat menembus nukleus dari bakteri untuk menghambat sintesis mRNA dan protein dengan cara berikatan pada DNA mikroba, dan yang terakhir kitosan dapat berperan dalam mempercepat fase proliferasi luka dengan cara mengaktifasi migrasi sel PMN, makrofag, dan memediasi proses fagositosis pada jaringan yang terluka, sehingga akan mempercepat pembentukan jaringan baru pada luka (Hanifah, 2015).

Kitosan yang diaplikasikan ke daerah luka akan menginduksi analgesia dengan memberikan efek dingin, nyaman, dan sejuk. Kitosan juga mengatur fungsi makrofag dan sekresi sejumlah enzim (seperti kolagenase) dan sitokin (seperti interleukin dan *tumornecrosis factor*) selama proses penyembuhan luka dan degradasi kitosan pada daerah luka, secara signifikan mempercepat proses penyembuhan luka. Kitosan juga mempunyai kemampuan untuk meningkatkan hemostasis, menurunkan fibroplasia, memfasilitasi osteogenesis dan meningkatkan regenerasi jaringan serta memiliki aktivitas antimikroba (Anggraeni, 2012).

2.4 Tikus

2.4.1 Klasifikasi

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau disebut juga tikus norwegia adalah salah satu hewan yang umum digunakan dalam eksperimental laboratorium.

Taksonomi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut (Shap dan Villano, 2013).

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Sub-Famili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Menurut Adiyati (2011), hewan coba merupakan hewan yang dikembangkan untuk digunakan sebagai hewan uji coba. Tikus sering digunakan pada berbagai macam penelitian medis selama bertahun-tahun. Hal ini dikarenakan tikus memiliki karakteristik genetik yang unik, mudah berkembang biak, murah serta mudah untuk mendapatkannya. Tikus merupakan hewan yang melakukan aktivitasnya pada malam hari (nocturnal).

2.4.2 Anatomi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

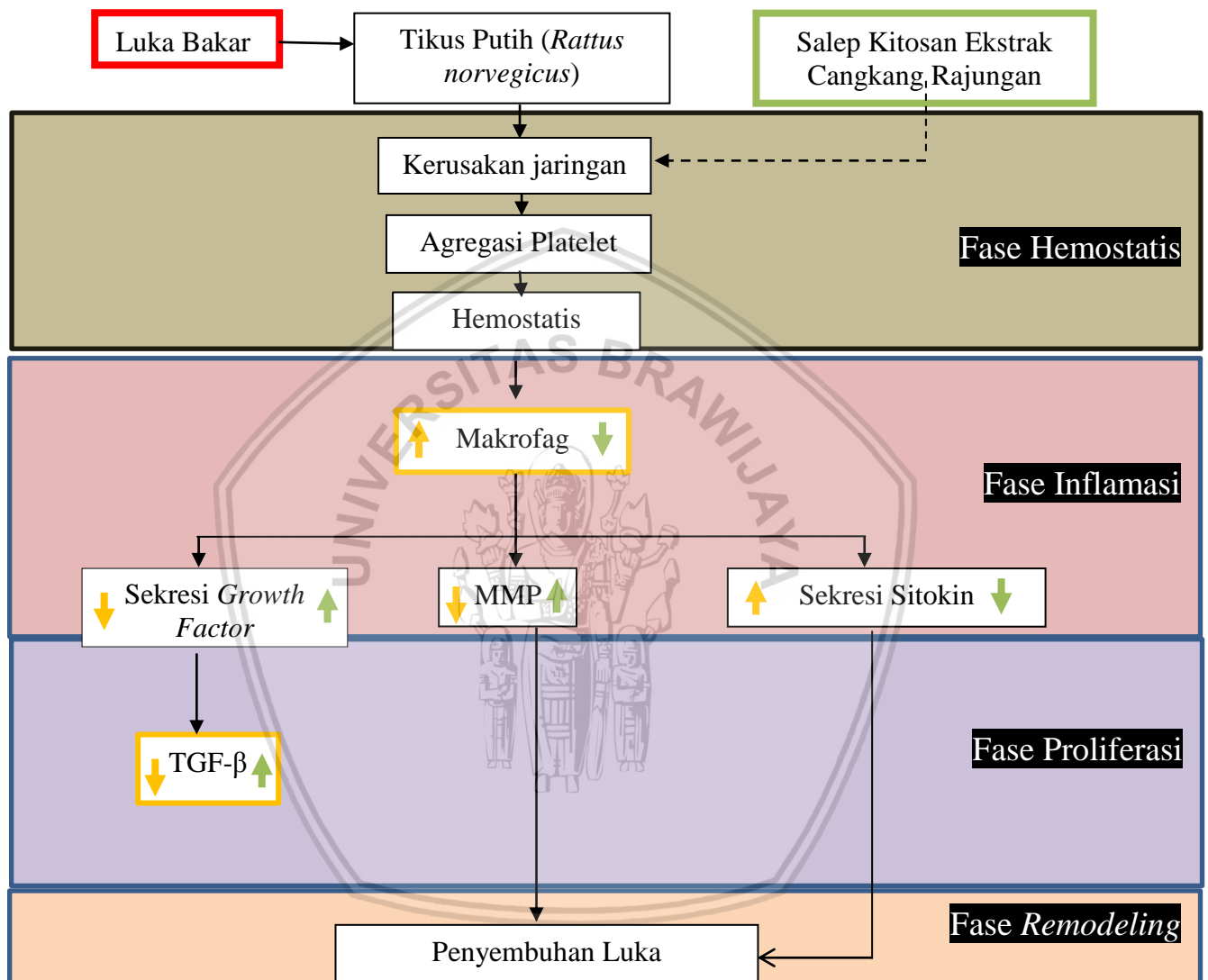
Menurut Sirois (2005), tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Spraguedawley* termasuk ke dalam hewan mamalia yang memiliki ekor panjang. Ciri-ciri galur ini yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih kecil. Telinga tikus ini tebal dan pendek dengan rambut halus. Mata tikus putih

berwarna merah. Ciri yang paling terlihat adalah ekornya yang panjang (lebih panjang dibandingkan tubuh). Bobot badan tikus jantan pada umur dua belas minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4 – 5 tahun dengan berat badan umum tikus jantan berkisar antara 267 – 500 gram dan betina 225 – 325 gram (Sirois, 2005).

Tikus dapat mendengar hingga suara ultrasonik dengan rentang pendengaran 70 dB yaitu 250 Hz-70 kHz dan rentang yang paling sensitif berkisar antara 8-32 kHz. Suara ultrasonik ini sangat penting sebagai alat berkomunikasi antara induk dengan anaknya. Galur ini memiliki pertumbuhan yang cepat, tempramen yang baik dan kemampuan laktasi yang tinggi. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) tersebar luas di beberapa tipe habitat, namun tikus putih lebih sering terlihat pada beberapa tempat yang merupakan habitat alami dari tikus putih, yaitu area pertanian, hutan alami maupun buatan, pesisir pantai, dan tempat-tempat yang lembab (Sirois, 2005).

BAB 3. KERANGKA TEORI, KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Keterangan :

↑↓ : Efek terapi salep kitosan ekstrak cangkang rajungan

↑↓ : Efek induksi luka bakar

□ : Induksi Salep Kitosan

□ : Induksi luka bakar

---- : Pemberian terapi

↓ : Proses/Pengaktifan

Luka bakar derajat II dalam dilakukan pada hewan model tikus putih *Rattus norvegicus*. Pada saat terjadi luka, tubuh memiliki cara tertentu sebagai upaya dari perbaikan jaringan. Cara atau fase tersebut, antara lain adalah fase hemostasis, inflamasi, proliferasi dan *remodelling*. Kerusakan jaringan terjadi yang terjadi menyebabkan platelet berkumpul pada daerah permukaan luka. Fase hemostasis ditandai dengan vasokonstriksi pembuluh darah, sumbatan trombosit, dan pembentukan fibrin plug sebagai proses koagulasi.

Proses inflamasi diperlukan untuk menyingkirkan jaringan mati dan melawan infeksi bakteri. Fase inflamasi diawali dengan migrasi monosit dalam darah yang akan teraktivasi dan menjadi makrofag setelah 48 jam. Sel yang mengalami kerusakan akan mengeluarkan sitokin proinflamasi yang berfungsi sebagai faktor kemotaktik dari sel radang seperti sel polimorfonuklear, makrofag, dan limfosit yang bergerak menuju area luka. Terjadi peningkatan jumlah makrofag yang akan menghasilkan sitokin, MMP dan juga *growth factor*, salah satunya berupa TGF- β . TGF- β berperan penting sebagai pengatur fungsi fibroblas dan juga pembentukan matrik ekstraselular pada fase selanjutnya yaitu proliferasi.

Fase proliferasi ditandai dengan mulai terbentuk jaringan granulasi pada luka yang terdiri dari jaringan kapiler baru (angiogenesis) dan fibroblas. Proses fibroplasia dan angiogenesis akan memicu proses reepitelisasi. Salah satu substansi yang berperan, yaitu KGF yang berfungsi untuk menstimulus mitosis sel epitel. Proses keratinisasi akan dimulai dari pinggir luka dan berakhir akan

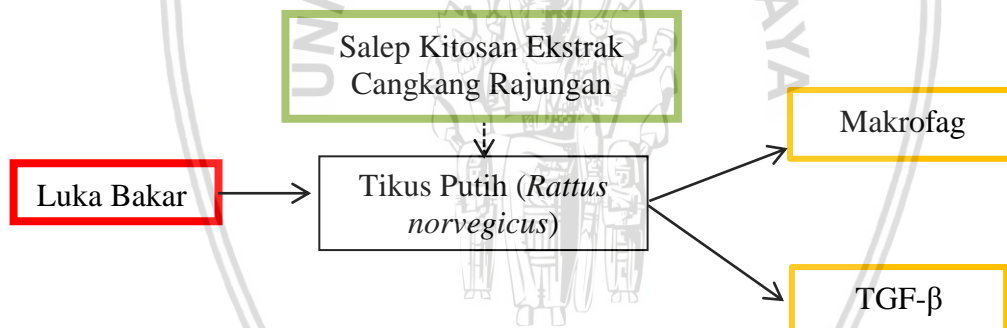
membentuk *barier* yang menutup permukaan luka. Peran TGF- β pada fase penyembuhan luka, yaitu sebagai faktor regulasi pada proses pembentukan monosit, fibroblas, sel endotel dan keratinosit. Pengaruh TGF- β terhadap kerja monosit terletak pada mekanisme hambatan dalam menghasilkan proteolitik dan menginduksi proses proliferasi, sehingga akan terbentuk jaringan kulit baru. Selain itu, kolagen yang dihasilkan fibroblas akan menyeimbangkan dan menyempurnakan jaringan pada dermis. Fibroblas akan berubah menjadi myofibroblas yang melakukan kontraksi pada jaringan. Fase proliferasi akan berakhir jika epitel dermis dan lapisan kolagen telah terbentuk.

Pada proses selanjutnya, yaitu fase *remodelling* akan terjadi penyempurnaan jaringan baru. Pada tahap ini warna kemerahan dari jaringan mulai berkurang karena pembuluh darah mulai regresi dan serat fibrin dari kolagen bertambah banyak untuk memperkuat terbentuknya jaringan ikat untuk kemudian terjadi penutupan luka.

Pemberian ekstrak cangkang rajungan dengan kandungan kitosan diharapkan dapat mempercepat proses penyembuhan luka. Kitosan juga memiliki fungsi sebagai anti mikroba dengan cara berikatan dengan dinding sel mikroba dan membran sitoplasma, sehingga akan menurunkan stabilitas osmotik, gangguan membran, dan dapat menembus nukleus dari bakteri untuk menghambat sintesis mRNA dan protein dengan cara berikatan pada DNA mikroba. Kitosan sebagai antiinflamasi sehingga dapat mempersingkat waktu terjadinya inflamasi serta dapat meningkatkan makrofag saat awal terjadinya

inflamasi. Selain itu kitosan mampu menstimulasi sel fibroblas, membantu deposisi kolagen, serta meningkatkan sintesis asam hyaluronic alami di lokasi luka sehingga membentuk jaringan granulasi dan berperan pada pembentukan jaringan ikat. Kitosan juga dapat membantu dalam sekresi enzim kolagenase yang dapat memecah kolagen muda yang terbentuk pada fase proliferasi menjadi kolagen yang lebih matang sehingga kekuatan dari struktur jaringan dapat menjadi lebih kuat dan proses penyembuhan luka dapat terjadi lebih cepat.

3.2 Kerangka Konsep



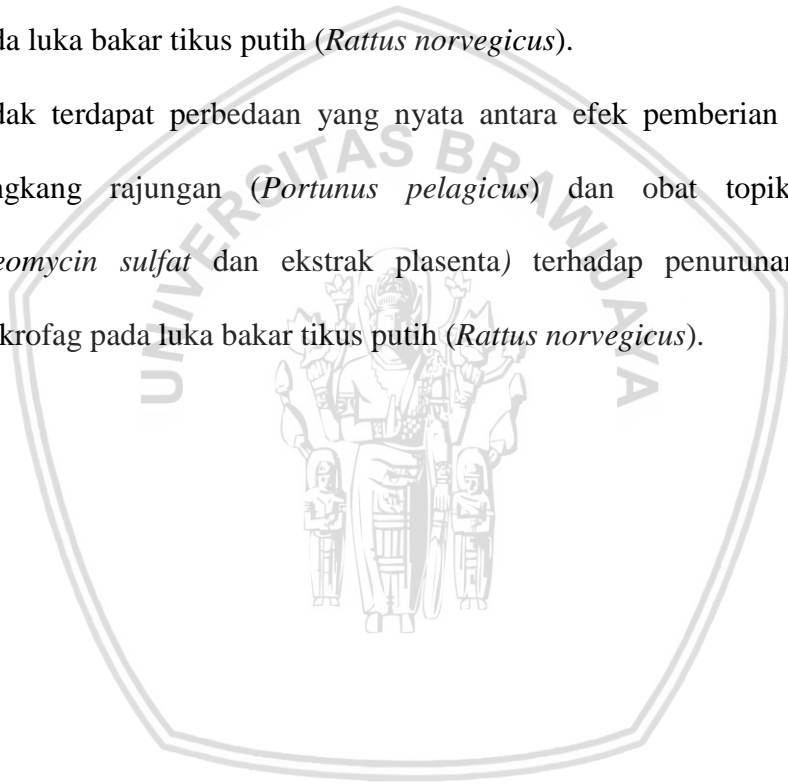
Keterangan

- : Induksi luka bakar
- : Induksi Salep Kitosan
- : Variabel yang diteliti
- ↓ : Proses/Pengaktifan

3.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini, yaitu :

1. Tidak terdapat perbedaan yang nyata antara efek pemberian salep ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dan obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan ekstrak plasenta) terhadap peningkatan ekspresi TGF- β pada luka bakar tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Tidak terdapat perbedaan yang nyata antara efek pemberian salep ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dan obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan ekstrak plasenta) terhadap penurunan jumlah sel makrofag pada luka bakar tikus putih (*Rattus norvegicus*).



BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai April 2018 dan dilakukan di beberapa laboratorium, yaitu :

1. Pemeliharaan hewan coba dan pemberian perlakuan hewan coba di Laboratorium Biokimia FK UB Malang.
2. Pembuatan ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) di Laboratorium Sintesis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.
3. Pembuatan preparat imunohistokimia dan pengamatan untuk ekspresi TGF- β dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UB Malang.
4. Pembuatan preparat histopatologi kulit dan pengamatan untuk jumlah sel makrofag dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UB Malang.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, yaitu kandang tikus, spuit 1 mL, glove, masker, spidol, alat cukur, stereofoam, kasa steril, timbangan, *water bath*, wadah air mendidih, *stopwatch*, pinset anatomis, alat penumbuk, mortar, ayakan, pot organ dan silet.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah kulit ranjungan, alkohol 70%, air mendidih suhu 98°C, normal saline 0,9%, obat anastesi (*ketamine-xylazine*), *vaseline album*, obat topikal komersial (*Neomycin sulfate* dan ekstrak plasenta) antibodi TGF- β , dan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar umur 2-3

bulan dengan berat 150-200 g. Serta alat dan bahan untuk pembuatan preparat imunohistokimia dan histopatologi.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
2. Prosedur ekstraksi kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*).
3. Pembuatan salep ekstrak kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*).
4. Perlakuan luka bakar derajat tipe II dalam pada hewan coba dengan menggunakan plat besi yang dimasukkan dalam air mendidih 100°C.
5. Terapi salep ekstrak kitosan dari cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*).
6. Perhitungan ekspresi TGF- β pada preparat kulit hewan coba dengan metode pewarnaan imunohistokimia dan perhitungan menggunakan immunoratio.
7. Perhitungan jumlah sel makrofag pada preparat histologi kulit pada model hewan coba.
8. Analisis data.

4.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah rancangan uji t merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan membandingkan kelompok perlakuan terdiri dari :

- 1) Kelompok 1 adalah tikus yang dibuat luka bakar dengan pemberian obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan ekstrak plasenta) yang diamati pada hari ke-1, 3 dan 7.
- 2) Kelompok 2 adalah tikus yang dibuat luka bakar dengan pemberian salep ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan salep 5% yang diperiksa pada hari ke-1, 3 dan 7.

4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Kriteria hewan model yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan dengan berat 150 - 200 g, berumur 2 -3 bulan. Masing-masing tikus dipelihara dalam kandang yang sama di ruangan yang sama, serta diberi makanan dalam jumlah dan jenis yang sama. Penelitian menggunakan 2 kelompok perlakuan yang terdiri dari 4 ulangan yang masing-masing di uji pada hari ke-1, 3 dan 7.

4.3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- a. Variabel bebas : Salep ekstrak kitosan kulit ranjungan (*Portunus pelagicus*)
dan obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan ekstrak plasenta)
- b. Variabel terikat : Penurunan jumlah sel makrofag dan ekspresi TGF- β
- c. Variabel kontrol : Homogenitas tikus meliputi jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, dan kandang serta pelakuan luka bakar.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan dengan berat 150-200 g berumur 2-3 bulan. Tikus diadaptasi selama 7 hari sebelum digunakan untuk penelitian dan dikandangkan secara individu. Untuk pemeliharaan pada hewan coba tersebut pakan diberikan berbentuk pelet sebanyak 10% berat badan setiap pagi dan sore dengan pemberian minum secara *ad libitum*. Tikus kemudian dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok 4 ekor didalam kandang secara individu. Kandang tikus berbahan plastik, dibagi menjadi 4 bagian menggunakan sekat dan dilengkapi tutup kandang berupa kawat ram. Bagian alas kandang diberi sekam kayu agar kandang tidak lembap (Muliani, 2011). Pemeliharaan tikus dilakukan di Laboratorium Biokimia FK UB Malang.

4.4.2 Prosedur Ekstraksi Kitosan Cangkang Rajungan

Bahan baku berupa cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) didapatkan dari *home industry* di daerah Sampang, Madura. Cangkang rajungan yang digunakan dibersihkan dari daging rajungan, kotoran, dan bagian-bagian tubuh rajungan yang masih melekat menggunakan air kran. Kemudian cangkang tersebut dikeringkan dibawah cahaya matahari langsung sampai kering. Setelah cangkang kering dihaluskan dengan cara ditumbuk dan diayak menggunakan ayakan ketebalan 50 mesh. Selanjutnya dilakukan ekstraksi kitosan yang terdiri dari tahapan deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilisasi.

a. Deproteinasi

Serbuk cangkang rajungan yang telah diayak sebanyak 400 g direaksikan dengan 3000 mL NaOH 1 M dan dihomogenkan menggunakan magnetik *stirrer* pada suhu 80 °C selama 1 jam. Kemudian padatan disaring dan residu tersebut dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 80°C hingga kering \pm 3 jam (Hastuti dan Tulus, 2015).

b. Demineralisasi

Serbuk hasil deproteinisasi sebanyak 200 g ditambah dengan 2000 mL HCL 1 M dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* selama 60 menit pada suhu kamar. Kemudian endapan disaring dan residu dicuci dengan akuades pH netral. Kemudian residu tersebut dikeringkan kembali dengan menggunakan oven bersuhu 80°C selama 3 jam. Hasil endapan ini disebut dengan kittin (Hastuti dan Tulus, 2015).

c. Deasetilisasi

Kittin yang telah dihasilkan dari proses demineralisasi berupa serbuk sebanyak 40 g ditambah dengan 250 NaOH 50%, kemudian direfluks didalam labu alas bulat selama 8 jam pada suhu 100°C. Hasil refluks kemudian didinginkan, disaring, lalu dicuci dengan *aquades* sampai pH netral. Kemudian endapan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 80°C selama 3 jam dan endapan yang telah kering diletakkan dalam desikator selama 24 jam. Endapan inilah yang dinamakan kitosan (Hastuti dan Tulus, 2015).

d. Identifikasi Kitosan dengan Metode FTIR

Identifikasi kitosan secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan uji FTIR (*Fourier Transform Infra Red*). Uji ini merupakan suatu teknik *spektrofotometri* inframerah yang dapat mengidentifikasi kandungan gugus fungsi suatu senyawa (Sjahfirdi dkk., 2015). Setelah proses deasetilisasi kitosan disimpan dalam desikator selama 24 jam sebelum dibuat pelet KBr (Kalium bromida). Pembuatan pelet KBr dengan mencampurkan sampel 1 mg dan KBr 10-100 mg. Campuran serbuk digerus hingga homogen dan ditekan dengan pompa hidrolik (Azhar dkk., 2010). Kemudian pelet tersebut di *scanning* pada daerah frekuensi antara 400 cm^{-1} sampai 4000 cm^{-1} . Spektrum hasil pengukuran yang diperoleh dibandingkan dengan spektrum kitosan standar (Rachmawati dkk., 2012).

4.4.3 Pembuatan Salep Kitosan Cangkang Rajungan

Pembuatan salep kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) menggunakan dasar salep hidrokarbon bahan *vaselin album*. *Vaselin album* memiliki kemampuan menghidrasi kulit sehingga dapat meningkatkan absorpsi zat aktif kitosan pada kulit (Naibaho dkk., 2013). Pembuatan dilakukan menggunakan *mortar* dengan mencampurkan vaselin album dan kitosan dengan konsentrasi 5% sebanyak 14 g. Kemudian salep kitosan disimpan dalam *tube* dilengkapi dengan label.

4.4.4 Pembuatan Luka Bakar pada Tikus

Langkah-langkah yang dilakukan untuk pembuatan luka bakar pada hewan coba adalah sebagai berikut (Akhoondinasab *et al.*, 2014 dengan modifikasi):

- 1) Menentukan daerah yang akan dibuat luka bakar yaitu bagian punggung.
- 2) Membersihkan bulu dan mencukur area tersebut sampai jarak 3 cm dari area yang akan dibuat luka bakar.
- 3) Memasang perlak atau alas dibawah tubuh tikus yang akan dibuat luka bakar.
- 4) Menuci tangan dan memakai sarung tangan steril.
- 5) Melakukan desinfeksi area kulit yang akan dibuat luka bakar dengan alkohol 70% dan tunggu hingga kering.
- 6) Melakukan anastesi pada area kulit yang akan dibuat luka bakar menggunakan *ketamine-xylaxine* dan setelah 10-15 menit dilakukan pembuat luka bakar.
- 7) Lempeng logam berukuran 25 x 20 x 2 mm dicelupin dengan air panas (suhu 100°) selama 15 menit.
- 8) Lempeng logam dipegang dengan menggunakan pinset dan ditempelkan tanpa penekanan pada hewan coba selama 15 detik.
- 9) Lempeng logam diangkat lalu kulit dikompres dengan normal salin selama 1 menit untuk mencegah perluasan luka di jaringan sekitar.
- 10) Memberikan perawatan pada area luka yang terbentuk sesuai prosedur rawat luka.

4.4.5 Terapi Salep Kitosan Cangkang Rajungan

Salep dibuat sejumlah 14 g pada konsentrasi yaitu, 5%. Salep diberikan sebanyak 0,25 g pada area luka secara aseptis dengan frekuensi pemberian 2 kali sehari selama 7 hari (Djamaluddin, 2009). Perhitungan dosis bisa dilihat pada **Lampiran 3.**

4.4.6 Pembuatan Preparat Histologi Kulit

Sebelum membuat preparat histologi jaringan kulit dilakukn euthanasi terlebih dahulu pada hewan coba dengan cara pemenggalan kepala (AVMA, 2013). Setelah itu dilakukan pengambilan jaringan kulit. Kulit digunting dengan ketebalan \pm 4 mm sampai dengan subkutan dan panjang 2,5 cm. Bagian kulit luka diisolasi dan dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9%. Kulit yang diperoleh kemudian dipotong menjadi dua bagian. Lalu bagian yang ingin digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dimasukkan ke dalam pot dan difiksasi dengan larutan *Buffer Natural Formaline* (BNF) dan dibiarkan pada suhu kamar selama 48 jam (Febram dkk., 2010). Sedangkan bagian kulit yang akan digunakan untuk pembuatan preparat imunohistokimia untuk perhitungan ekspresi TGF- β dimasukkan ke pot lain.

Sediaan kulit yang telah difiksasi menggunakan BNF 10% dilakukan *tissue trimming* jaringan dan dimasukkan ke dalam casette tissue dari plastik. Kemudian dilakukan proses dehidrasi alkohol menggunakan konsentrasi alkohol bertingkat yaitu 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I, alkohol absolut II masing-masing selama 2 jam. Setelah itu dilakukan penjernihan menggunakan xylol I dan xylol II masing-masing

selama 2 jam. Dilanjutkan dengan proses pencetakan atau parafinisasi menggunakan parafin I dan parafin II. Sediaan dimasukkan ke dalam cetakan yang berisi parafin setengah volume dan potongan melintang sediaan melekat pada dasar parafin. Setelah mulai membeku maka parafin ditambahkan lagi dalam pencetak hingga penuh dan dibiarkan mengeras. Setelah blok parafin mengeras dilakukan pemotongan setebal 5 mikrometer menggunakan mikrotom. Hasil potongan yang berbentuk pita (*ribbon*) tersebut dibentangkan diatas air hangat yang bersuhu 46°C dan langsung diangkat untuk meregangkan potongan agar menghilangkan lipatan akibat dari pemotongan. Sediaan tersebut kemudian diangkat dan diletakkan diatas gelas objek dan dikeringkan semalaman dalam inkubator bersuhu 60°C untuk dilakukan pewarnaan Hematoksilen-Eosin (HE) (Febram dkk., 2010).

4.4.7 Perhitungan Jumlah Sel Makrofag pada Kulit

Penentuan jumlah sel makrofag kulit tikus didapatkan melalui pengamatan pada sediaan histopatologi sel makrofag kulit tikus dengan pengecatan HE di lapisan dermis. Interpretasi hasil pengamatan yaitu banyaknya makrofag yang terbentuk diidentifikasi dengan bulat berwarna merah muda yang memiliki sitoplasma dan nukleus menggunakan mikroskop BX51 perbesaran 400x. Jumlah makrofag dihitung pada lima lapang pandang berbeda dari masing-masing preparat dengan bantuan *software Imageraster* dan kemudian diambil nilai rata-rata dari jumlah sel tersebut (Balqis dkk., 2014).

4.4.8 Prosedur Imunohistokimia Ekspresi TGF- β

Imunohistokimia merupakan proses untuk mendeteksi antigen (protein, karbohidrat, dsb) pada sel dari jaringan dengan prinsip reaksi antibodi yang berikatan terhadap antigen pada jaringan. Imunohistokimia seringkali digunakan untuk mengukur dan mengidentifikasi proses proliferasi sel dan apoptosis sel (Ramos, 2005). Teknik ini diawali dengan pembuatan preparat histologi agar dapat diamati di bawah mikroskop. Preparat jaringan yang telah didapat selanjutnya memasuki prosedur IHK. Prosedur IHK menggunakan antibodi yang dilabeli enzim sehingga ikatan protein dan antibodi dapat divisualisasikan. Enzim selanjutnya direaksikan dengan substrat kromogen yang dapat diamati dengan mikroskop cahaya (Fatchiyah dkk., 2009).

Tahapan pewarnaan imunohistokimia diawali dengan perendaman slide pada xylol I, xylol II, dan alcohol bertingkat (70%, 80%, 90%). Slide preparat kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 1x15 menit. Selanjutnya ditetesi dengan H_2O_2 selama 20 menit. Setelah itu di cuci kembali dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan 5% PBS selama 1 jam. Kemudian, slide preparat dicuci kembali selama 5 menit sebanyak 3 kali dan selanjutnya diinkubasi dengan antibodi TGF- β selama 1 jam dengan suhu ruang dan dilakukan pencucian kembali menggunakan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Berikutnya, diinkubasi dengan antibodi sekunder selama 1 jam dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali.

Slide preparat ditetesi dengan *Strept Avidin Horse Radish Peroxidase (SA-HRP)* selama 40 menit. *Diaminobenzidine (DAB)* ditetaskan selama 10 menit.

Kembali dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya *counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 10 menit. Slide di cuci dengan air mengalir. Slide dibilas dengan aquades dan dikeringkan, lalu slide dimounting dengan etellan dan ditutup dengan *cover glass*.

Pengamatan ekspresi TGF- β dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400x dengan lima bidang pandang pengamatan. Pengamatan dilakukan pada bagian dermis. Setelah itu hasil pengamatan difoto. Hasil foto dari mikroskop diproses menggunakan *software imunoratio* untuk mengamati peningkatan ekspresi TGF- β yang ditandai dengan peningkatan presentasi luas daerah yang terwanai (Janquiera and Carneiro, 2007).

4.4.9 Analisa Data

Dalam penelitian ini parameter yang digunakan adalah jumlah sel makrofag dan ekspresi TGF- β , dianalisis secara kuantitatif menggunakan *Microsoft Excel* dan *SPSS for windows 10 Pro version 1709*, dengan uji t untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar dua kelompok perlakuan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Uji FTIR Ekstrak Kitosan yang dari Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*).

Kitosan yang diperoleh dari cangkang rajungan diuji menggunakan uji FTIR **Lampiran.5** yang diperoleh dibaca dengan spektroskopi inframerah yang berguna untuk identifikasi senyawa organik karena spektrumnya yang sangat kompleks yang terdiri dari banyak puncak-puncak . Selain itu, masing-masing kelompok fungsional menyerap sinar inframerah pada frekuensi yang unik (Silviah, dkk., 2014).

Kitosan cangkang rajungan uji FTIR dibandingkan dengan standar kitosan. Kitosan dari ekstrak cangkang rajungan didapatkan hasil 873,68; 1034,63; 1156,66; 1261,70; 1422,61; 1555,66; 1658,66; 2148,77; 2518,75; 2923,67; 3438,58 cm^{-1} . Spektrum inframerah kitosan standar memiliki panjang gelombang kisaran 897,41; 1026,63; 1077,93; 1154,64; 1259,54; 1422,73; 1587,94; 1587,94; 1660,55; 2361,41; 2922,85; 2922,85; 3377,95 cm^{-1} (Dompeioen, 2017).

Kitosan komersial menurut Sarbon *et al.* (2014) terdapat pita serapan dari N-H amida pada bilangan gelombang 3369,11 – 3413,07. Pita serapan C-O alkohol pada rentang 1128,21 – 1129,02. Pita N-H amina didapatkan pada 1622,76 – 1129,02. Pita N-H amina didapatkan pada 1622,76 – 1623,92 cm^{-1} .

Berdasarkan penelitian ekstrak cangkang rajungan memiliki kadar kitosan sesuai dengan uji FTIR pada puncak N-H amida yang tidak tajam dan

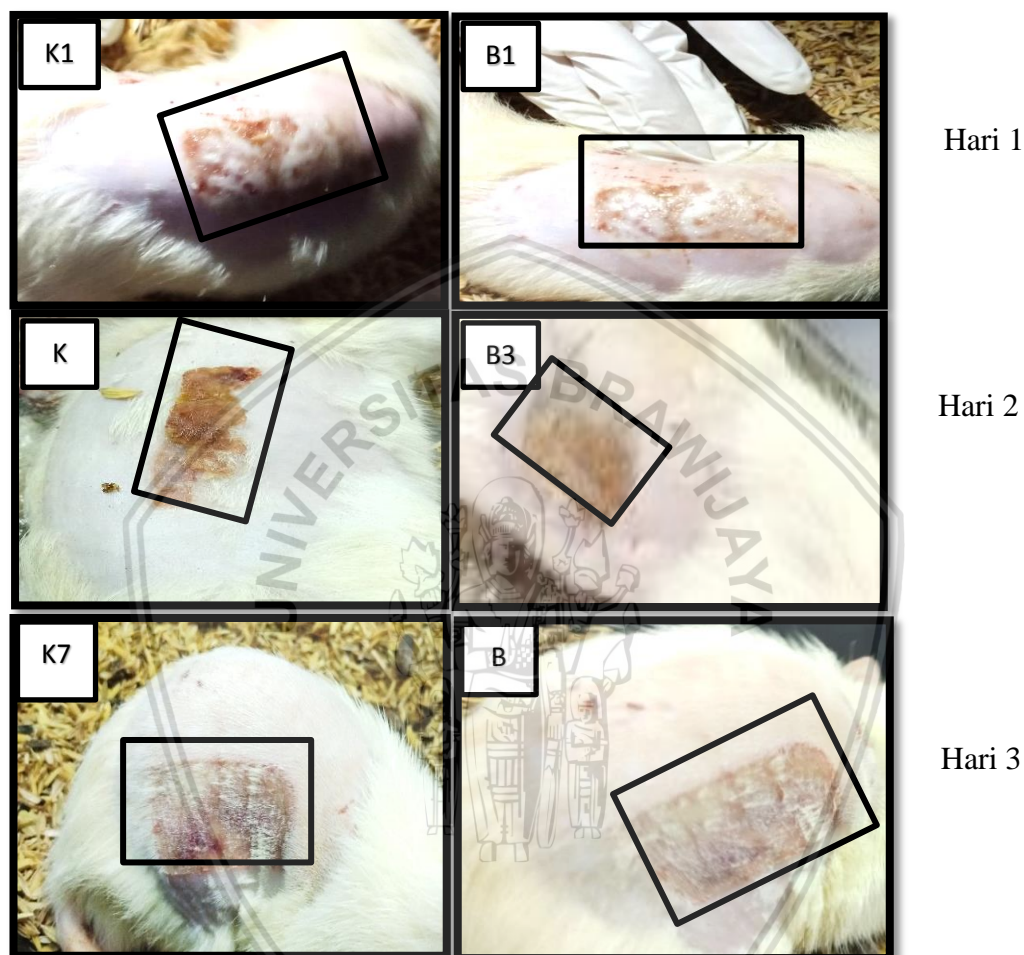
memiliki hasil yang hampir sama dengan spektroskopi inframerah kitosan standar.

5.2 Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Kitosan Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap Gambaran Makroskopis pada Kulit Tikus Pasca Luka Bakar

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diberikan perlakuan berupa luka bakar derajat II dalam sepanjang 2,5 cm dengan lebar 2 cm, dengan cara menempelkan lempeng logam pada punggung tikus selama 15 detik. Lempeng logam yang digunakan sudah direndam di air mendidih bersuhu 100°C selama 15 menit. Setelah itu kulit yang sudah terkena lempeng logam diberikan cairan normal saline selama 1 menit untuk mempertahankan permukaan luka agar tetap lembab. Kemudian diberikan terapi berupa salep ekstrak kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) secara topikal dengan konsentrasi 5% sebanyak 0,25 g selama 7 hari dan digunakan obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan ekstrak plasenta) sebagai kontrol. Perkembangan kesembuhan luka bakar tikus secara makroskopis dapat dilihat pada (**Gambar 5.1**).

Luka adalah rusak atau hilangnya jaringan tubuh yang terjadi karena adanya suatu faktor yang mengganggu sistem perlindungan tubuh (Suryadi, 2013). Gambaran makroskopis jaringan kulit tikus terapi salep kitosan hari ke-1 (K1) dan obat topikal komersial hari ke-1 (B1) menunjukkan kondisi jaringan terlihat lebih putih kemerahan dibandingkan warna jaringan sehat disekitarnya. Menurut Marg *et al.*, (2013) luka bakar derajat IIB mengalami kerusakan pada seluruh lapisan epidermis dan 1/2 sampai 7/8 lapisan dermis.

Gejala yang terlihat yaitu luka berwarna merah muda sampai merah, hingga putih, konsistensi lunak dan adanya nyeri.



Gambar 5.1. Gambaran makroskopis kulit tikus pasca luka bakar derajat II dalam pada hari ke-1, ke-3, dan ke-7.

Keterangan : (K1) Terapi salep kitosan hari ke-1 (K3) Terapi salep kitosan hari ke-3 (K7) Terapi salep kitosan hari ke-7 (B1) Obat topikal komersial hari ke-1 (B3) Obat topikal komersial hari ke-3 (B7) Obat topikal komersial hari

Gambaran luka bakar setelah diterapi hingga hari ke-3 menunjukkan proses kesembuhan luka. Kelompok perlakuan terapi salep kitosan (K3) menunjukan terjadinya pembentukan keropeng yang sudah kering, panjang luka 2,5 cm dan juga perubahan warna menjadi coklat. Kelompok perlakuan

obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan ekstrak plasenta) (B3) menunjukkan area luka sudah mulai mengering dan panjang luka 2,3 cm. Pembentukan keropeng menunjukkan proses penyembuhan memasuki fase proliferasi tahap awal (Fitriani, 2016). Keropeng terbentuk karena denaturasi protein pada lapisan kulit, terdapat pada zona koagulasi. Keropeng yang terbentuk diatas permukaan luka membantu hemostatis dan mencegah kontaminasi mikroba (Argamula, 2008).

Gambaran makroskopis luka pada hari ke-7 menunjukkan proses penyembuhan pada kedua kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan terapi salep kitosan (K7) menunjukkan gambaran yang sama dengan kelompok obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan ekstrak plasenta) (B7), yaitu adanya pertumbuhan rambut disekitar luka yang menandakan adanya perbaikan folikel rambut pada lapisan dermis, dan terlihat keropeng yang telah terlepas. Kelompok perlakuan terapi salep kitosan memiliki panjang luka yaitu 2.5 cm sedangkan pada kelompok obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan ekstrak plasenta) 2.3 cm.

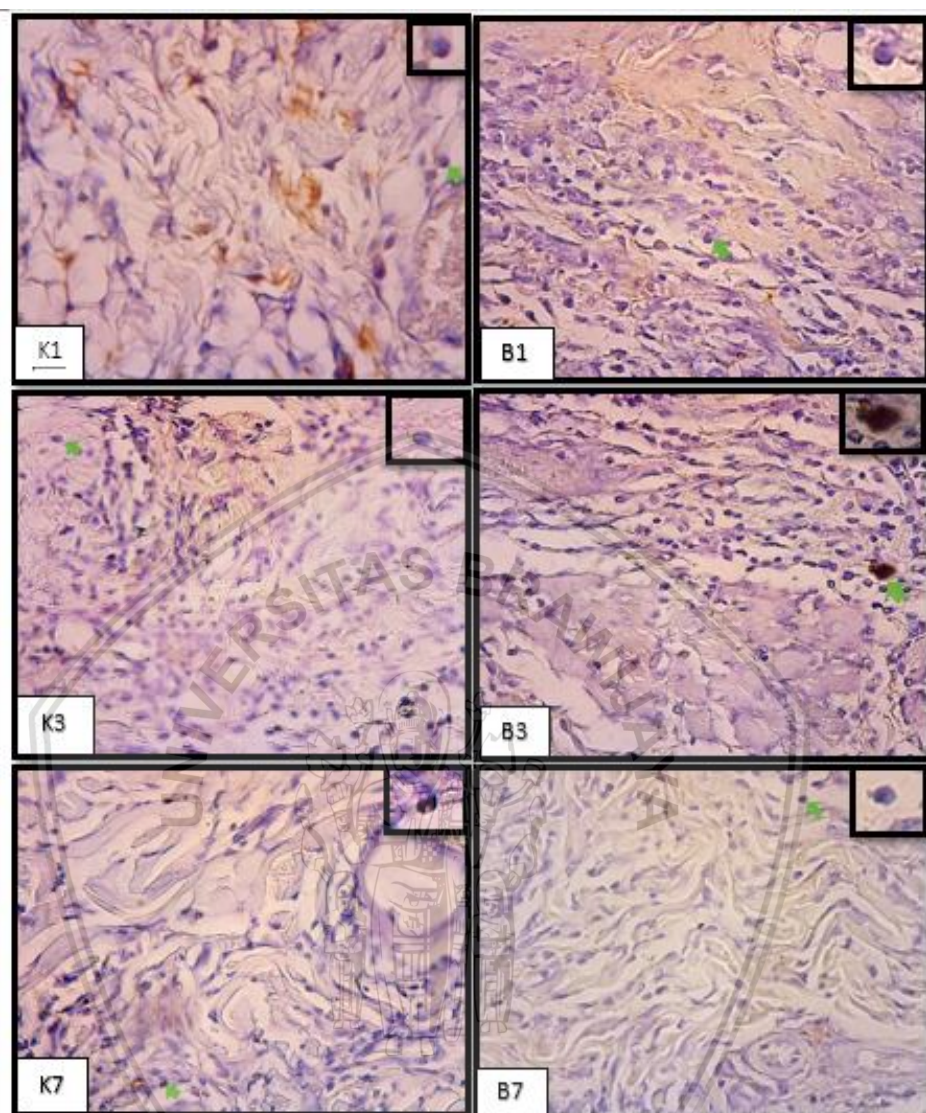
Untuk mengetahui pengaruh pemberian salep ekstrak kitosan cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap jumlah makrofag pada jaringan kulit pasca luka bakar dilakukan pewarnaan dengan metode HE dan ekspresi TGF- β dengan metode IHK.

5.2 Ekspresi TFG- β pada Luka Bakar

Transforming Growth factor- Beta (TFG- β) adalah sitokin polipeptida multifungsional yang disekresikan oleh berbagai sel dalam tubuh seperti platelet, makrofag, limfosit T dan fibroblas.

Pengukuran presentase hasil ekspresi TGF- β dilakukan menggunakan *software ImmunoRatio*. Ekspresi TGF- β ditunjukkan dengan warna coklat pada luas area. Warna coklat yang muncul disebabkan oleh ikatan antara antigen pada jaringan dan antibodi yang diberikan. Antibodi primer akan berikatan dengan antigen pada jaringan dan antibodi sekunder yang diikuti dengan penambahan enzim SA-HRP (*Strepta Avidin Horseradish Peroxidase*) dan substrat berupa kromagen DAB sehingga menghasilkan warna kecoklatan pada target yang spesifik (**Gambar 5.2**).

Data hasil immunoratio didapatkan jumlah rata-rata luas area bewarna kecoklatan hasil dari ekspresi TGF- β dan didapatkan jumlah rata-rata ekspresi yang dapat dilihat pada **Tabel 5.1**. Data yang diperoleh kemudian diuji menggunakan uji normalitas dan homogenitas. Jika hasil data normalitas dan homogenitas ($p > 0.05$) maka dilanjutkan dengan uji t yaitu membandingkan t hitung dan t tabel 5% (3.182) terdapat pada **Lampiran 6**.



Gambar 5.2 Gambaran mikroskopis ekspresi TGF- β pada jaringan dermis kulit tikus metode imunohistokimia perbesaran (400x).

Keterangan : (K1) Kitosan hari ke-1 (K3) Kitosan hari ke-3 (K7) Kitosan hari ke-7 (B1) obat topikal komersial hari ke-1 (B3) obat topikal komersial hari ke-3 (B7) obat topikal hari ke-7 (→) Makrofag yang terekspresi.

Tabel 5.1 Data Jumlah Ekspresi TGF- β Kelompok Perlakuan Salep Kitosan dan Kelompok Kontrol Positif Hari ke-1, 3, dan 7.

Kelompok	Rata-rata Jumlah Ekspresi TGF- β (%)		
	Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-7
	(mean \pm SD)	(mean \pm SD)	(mean \pm SD)
Kitosan 5%	(40.9 \pm 6.87)	(41.2 \pm 4.78)	(53.0 \pm 4.44)
Obat topikal komersial	(37.9 \pm 10.8)	(40.3 \pm 7.69)	(54.59 \pm 10.2)

Berdasarkan **Tabel 5.1** dapat dilihat bahwa K1 dan B1 menunjukkan jumlah ekspresi TGF- β (40.9 \pm 6.87)% dan (37.9 \pm 10.8). Kedua kelompok menunjukkan presentase terkecil dibanding pada hari ke-3 dan ke-7. Hari ke-1 TGF- β masih rendah karena pada fase inflamasi yang menghasilkan TGF- β hanyalah platelet. Berdasarkan uji t hitung tidak ada perbedaan yang nyata antara kedua kelompok perlakuan.

Pada K3 menunjukkan ekspresi TGF- β yaitu (41.2 \pm 4.78)% dan B3 yaitu (40.3 \pm 7.69)%. Kedua kelompok menunjukkan presentase yang meningkat dibandingkan hari ke-1. Hal ini disebabkan karena pada hari ke-3 merupakan tahap awal proliferasi, dimana yang menghasilkan TGF- β adalah makrofag dan fibroblas. TGF- β dapat merangsang maturasi fibroblas, migrasi, dan sintesis matriks ekstraseluler. Fibroblas merupakan elemen selular yang banyak ditemukan pada jaringan ikat dan aktif mensintesis komponen matriks pada

proses penyembuhan luka dan perbaikan jaringan yang rusak. Fibroblas merupakan bahan dasar pembentukan kolagen yang memberikan kekuatan daya rentang pada penyembuhan luka, berproliferasi dan memproduksi matriks kolagen untuk memperbaiki jaringan rusak. Berdasarkan uji t hitung tidak ada perbedaan yang nyata antara kedua kelompok perlakuan.

Hari ke 7 ekspresi TGF- β untuk kelompok K7 yaitu $(53.0 \pm 4.44)\%$ dan B7 yaitu $(54.59 \pm 10.2)\%$. Pada K7 juga menunjukkan rata-rata ekspresi TGF- β meningkat dibandingkan hari ke-1 dan ke-3. Pada hari ke-7 proses penyembuhan masih dalam fase proliferasi sehingga yang menghasilkan TGF- β yaitu makrofag dan fibroblas. Fase proliferasi terjadi pada hari ke-3 hingga hari ke 14 setelah terjadinya luka (Tifani, 2015). TGF- β memiliki beberapa peran penting dalam pembentukan matrik ekstraseluler, yaitu meningkatkan pergerakan sel epidermis, pembentukan kolagen, proteoglikan, dan fibronectin, serta mengurangi produksi dari enzim protease yang merusak matriks. Berdasarkan uji t hitung tidak ada perbedaan yang nyata antara kedua kelompok perlakuan.

Pada kedua kelompok hari ke-1, 3 dan 7 tidak terdapat perbedaan yang nyata. Hal ini menandakan antara kitosan dan obat topikal komersial (*Neomycin sulfate* dan ekstrak plasenta) mempunyai efek yang sama terhadap ekspresi TGF- β . Hasil tersebut menunjukkan bahwa salep ekstrak cangkang rajungan dapat menyembuhkan luka bakar derajat II dalam sama halnya dengan obat topikal komersial (*Neomycin sulfate* dan ekstrak plasenta).

Berdasarkan penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa cangkang rajungan mengandung kitin yang dapat dikonversikan menjadi kitosan, selain itu kandungan dari cangkang rajungan yaitu kadar air, mineral dan juga protein yang akan dihilangkan. Kitosan merupakan kopolimer yang terdiri atas glikosamin dan N-asetil glukosamin (Dai et al. 2011). Kitosan akan terbiodegradasi oleh enzim lisosim yang merupakan katalis untuk mendegradasi kitosan *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk polimer menjadi *N-acetyl-D-glucosamine* bentuk diner aktif dan membentuk *cross-linked* dengan *glycosaminoglycan* dan *glycoprotein* yang merupakan makromolekul matriks ekstraseluler serta menstimulasi peningkatan TNF- alfa, TGF- β dan FGF-2 (Chin & Halim, 2009).

Pemberian kitosan akan memicu sel makrofag untuk meningkatkan produksi sitokin yang berupa TGF- β 1 (Sularsih, 2011). Kitosan sebagai haemostasis dengan menstimulus faktor pertumbuhan darah seperti prombin dan fibrinogen (Paul dan Sharma, 2004). Penggunaan kitosan dapat menstimulus *growth factor* sehingga dapat meningkatkan ekspresi TGF- β yang menunjang proses penyembuhan luka.

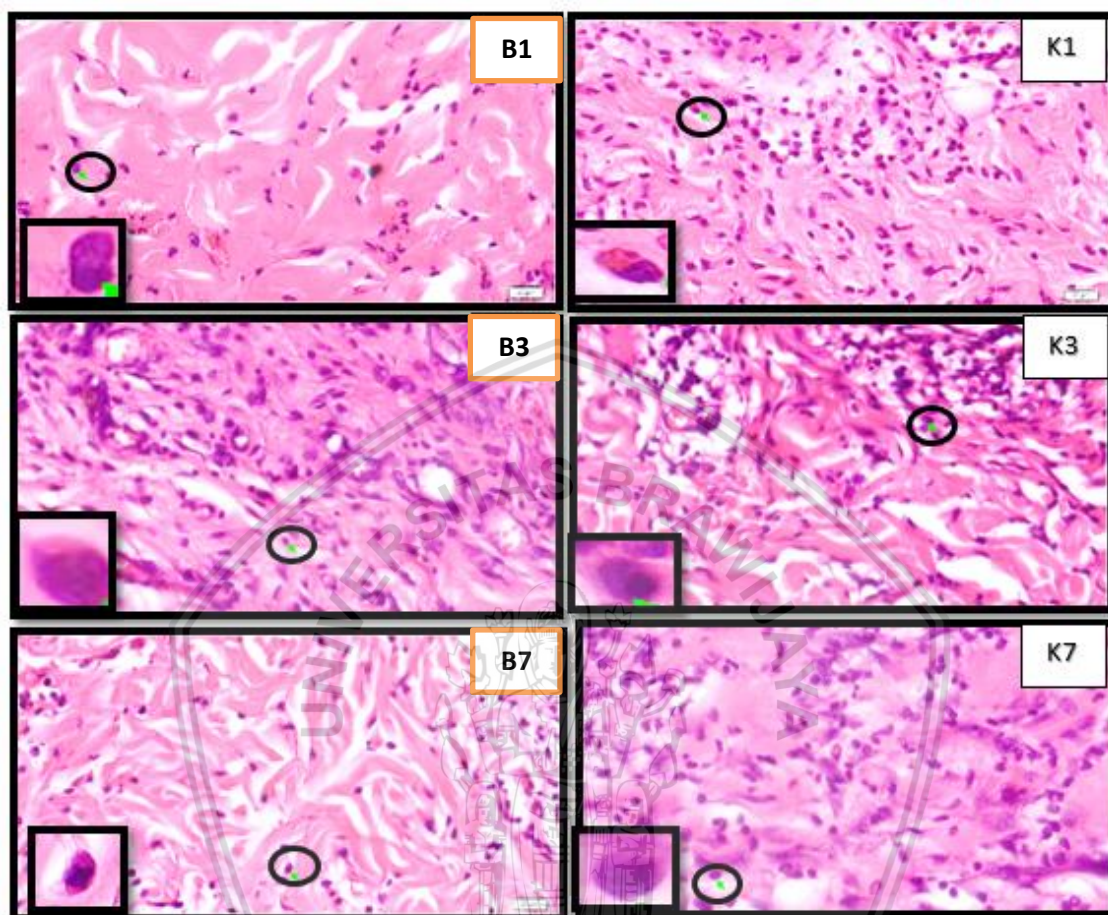
5.3 Efek Pemberian Salep Kitosan Ekstrak Cangkang Rajungan pada Tikus Pasca Luka Bakar Derajat II dalam terhadap Jumlah Makrofag

Respon tubuh terhadap luka pertama kali yaitu terjadinya fase inflamasi yang didahului dengan agregasi trombosit sehingga terjadi penghentian pendarahan. Selain itu trombosit juga mengeluarkan thromboxane dan serotonin yang

merangsang hemostatis dengan vasokonstriksi. Sekitar 5-10 menit awal terjadinya luka terjadi intensitas vasokonstriksi diikuti vasodilatasi karena permeabilitas pembuluh darah meningkat (Mackay dan Miller, 2003). Maka akan terjadi peningkatan platelet, yang akan mensekresi faktor yang merangsang pembekuan darah. Trombosit kemudian beragregasi sepanjang endotelium pembuluh darah dan fibronogen diubah menjadi monomer fibrin sehingga akan membentuk bekuan darah yang mencegah kebocoran pembuluh darah (Shai dan Maibach, 2005). Selain itu trombosit juga mengeluarkan histamin yang merangsang polymorphonuclear (PMN) ketempat luka. Sel polimorfonuklear (PMN) merupakan sel inflamasi pertama yang bermigrasi menuju area luka berupa neutrofil, kemudian digantikan oleh sel mononuklear atau makrofag (Izzaty, 2014).

Makrofag merupakan diferensiasi dari sel monosit yang telah meninggalkan sirkulasi darah dan menuju ke daerah jaringan yang mengalami gangguan. Secara histologi makrofag memiliki bentuk yang ameboid (bentuknya tidak tetap), serta memiliki inti sel yang relatif besar. Plasmanya agranulosit atau tidak mengandung granula (butiran). Hasil perhitungan makrofag dilakukan dengan menghitung manual, metode histopatologi pewarnaan *Hematoxylin eosin*

Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Gambaran mikroskopis jumlah sel makrofag jaringan kulit tikus dengan pengecatan hematoxylin eosin perbesaran (400x).

Keterangan : (B1) obat topikal komersial hari ke-1 (B3) obat topikal komersial hari ke-3 (B7) obat topikal komersial hari ke-7 (K1) Kitosan 5% hari ke-1 (K3) Kitosan 5% hari ke-3 (K7) Kitosan 5% hari ke-7(○) menunjukkan sel makrofag.

Tabel 5.2 Data Jumlah Makrofag

Kelompok	Pengamatan Jumlah Makrofag (%)		
	Hari ke-1	Hari ke-3	Hari ke-7
	(mean±SD)	(mean±SD)	(mean±SD)

Kitosan 5%	(4.37±1.09)	(8.10±1.08)	(5.45±0.50)
Obat topikal komersial)	(4.17±1.25)	(6.92±0.48)	(4.45±1.06)

Berdasarkan **Tabel 5.2** rata-rata jumlah makrofag pada B1 (4.17±1.25) sel dan K1 (4.37±1.09) sel lebih kecil dibandingkan hari ke-2 dan ke-3. Hal ini karena pada hari pertama setelah terjadinya luka adalah fase inflamasi, dimana sel radang pertama yang berperan pada daerah luka yaitu neutrofil. Neutrofil memiliki fungsi sebagai antimikroba bawaan, selain itu neutrofil melepaskan protease untuk menghilangkan komponen-komponen ECM yang terdenaturasi (Pakyari, 2012). Secara normal sel radang berada pada pembuluh darah. Ketika terjadi perlukaan maka sel-sel radang akan mengalami kemotaksis. Sel monosit yang berada dalam darah akan teraktivasi dan menjadi makrofag setelah 48 jam, yang berperan besar dalam tahap inflamasi (Rajan dan Murray, 2008). Makrofag pada tahap inflamasi berperan sebagai fagosit profesional dan sebagai APC (antigen presenting cell) yang berfungsi menyajikan antigen kepada limfosit. Selain itu makrofag juga dapat mensekresikan beberapa sitokin sebagai respons terhadap patogen antara lain *interleukin 1* (IL-1), *interleukin-6* (IL-6), *inteleukin 12* (IL-12), *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dan *kemokin IL-8* (Sunardi, 2002).

Pada hari ke-3, B3 menunjukkan rata-rata jumlah makrofag (6.92±0.48) sel dan K3 (8.10±1.08) sel. Kedua perlakuan tersebut mengalami peningkatan

dibandingkan hari ke-1. Hal ini disebabkan karena pada hari ke-3 sudah memasuki fase proliferasi. Menurut Diegelman (2004) fase proliferasi terdiri atas proses reepitelisasi, neovaskularisasi dan pembentukan jaringan granulasi. Makrofag pada fase proliferasi berfungsi untuk menghasilkan mediator yang memodulasi kesembuhan luka, termasuk di dalamnya faktor pertumbuhan fibroblas (*fibroblast growth factor/FGF*), faktor pertumbuhan pengubah (*transforming growth factor/TGF- α* dan *TGF- β*), interleukin dan matriks metalloproteinase (*MMPs*) (Hidayat, 2015). MMP memiliki peran penting pada sel-sel permukaan ECM aktivasi protein pada matrix ekstraseluler. MMP menghancurkan sel-sel permukaan atau sel-molekul matrix ekstraseluler yang mengubah sel-matriks atau interaksi sel-sel, dan melepaskan growth factor. MMP berperan dalam migrasi sel, diferensiasi sel, pertumbuhan sel, apoptosis. Berdasarkan uji t hitung tidak ada perbedaan yang nyata antara kedua kelompok perlakuan.

Hari ke-7 menunjukkan rata-rata B7 (4.45 ± 1.06) sel dan K7 (5.45 ± 0.50) sel. Pada kedua kelompok tersebut menunjukkan rata-rata jumlah makrofag mengalami penurunan. Terjadinya penurunan pada jumlah makrofag dikarenakan pada fase proliferasi yang menonjol adalah proses proliferasi fibroblas. Fase ini terjadi mulai dari akhir fase inflamasi pada hari ke-3 hingga hari ke 14 setelah terjadinya luka (Tifani, 2015). Berdasarkan uji t hitung tidak ada perbedaan yang nyata antar kedua kelompok perlakuan.

Pada kedua kelompok hari ke-1, 3 dan 7 tidak terdapat perbedaan yang nyata. Hal ini menandakan antara kitosan dan obat topikal komersial (*Neomycin sulfate* dan ekstrak plasenta) mempunyai efek yang sama. Hasil tersebut menunjukkan bahwa salep ekstrak cangkang rajungan dapat menyembuhkan luka bakar derajat II dalam sama halnya dengan obat topikal komersial (*Neomycin sulfate* dan ekstrak plasenta).

Obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan ekstrak plasenta) mengandung ekstrak placenta dan neomycin sulfat. Ekstrak placenta digunakan untuk mempercepat penyembuhan luka dengan cara meningkatkan faktor pertumbuhan TGF- β pada awal penyembuhan luka (MIMS, 2017). Sedangkan *neomycine sulfat* merupakan golongan aminoglikosida berspretrum luas peka terhadap gram negatif dan gram positif, yang bersifat bakteriosidal. Neomycine bekerja dengan cara berikatan dengan subunit 30s ribosom dan menghambat sintesis protein, sehingga dapat mempercepat transport neomycine kedalam sel yang menyebabkan kerusakan pada membran sitoplasma yang selanjutnya menyebabkan kematian sel (Plumb, 2008).

Kitosan memiliki fungsi sebagai antibakteri dan antiinflamasi. Kitosan sebagai antibakteri terjadi karena adanya gugus fungsional amina yang bermuatan positif pada kitosan yang dapat berikatan dengan membran sel bakteri yang cenderung bermuatan negatif. Interaksi ini dapat menyebabkan ketidakseimbangan tekanan interna sel dan dapat menyebabkan kebocoran

intraseluler bakteri sehingga sel bakteri menjadi lisis dan akhirnya mati (Komariah, 2014).

Kitosan dapat memacu migrasi neutrofil, aktivitas makrofag dan memediasi proses fagositosis pada jaringan yang terluka sehingga dapat mempercepat proses inflamasi dan perbaikan jaringan yang rusak. Selain itu, terapi kitosan didukung oleh sifat basis *vaselin album*. Menurut Naibaho, dkk (2013) salep dengan bahan dasar hidrokarbon memiliki waktu kontak dan daya absorpsi yang tinggi pada kulit sehingga dapat mendukung aktivitas senyawa aktif dalam penyembuhan luka.

Kitosan pada setiap jenis hewan berbeda-beda kadar yang didapatkan. Pada kepiting didapatkan kitosan sebesar 69%, pada udang sebesar 70% dan rajungan sebesar 73%. Pada penelitian ini didapatkan kitosan dari rajungan sebesar 53,38%. Perbedaan hasil yang didapatkan tergantung dari proses deasetilisasi, deproteinasi dan demineralisasi.

Berdasarkan hasil penelitian dengan parameter makrofag dan TGF- β . Dapat dilihat tidak terdapat perbedaan antara rata-rata jumlah makrofag kelompok obat topikal komersial (*Neomycin sulfate* dan ekstrak plasenta) dan kelompok perlakuan kitosan. Hasil yang didapatkan terjadi penurunan pada hari ke-7 yang merupakan fase proliferasi. Makrofag pada fase proliferasi akan mengeluarkan *growth factor* berupa TGF- β , yang berfungsi dalam proses kemotaksis fibroblas

ke area luka. Berdasarkan hasil imunoratio ekspresi TGF- β mengalami peningkatan pada hari ke-3 dan 7.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan yaitu :

1. Efek pemberian salep kitosan ekstrak cangkang rajungan relatif tidak berbeda dengan pemberian obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan ekstrak plasenta) pada luka bakar terhadap peningkatan TGF- β pada hari ke-1, 3 dan 7.
2. Efek pemberian salep kitosan ekstrak cangkang rajungan relatif tidak berbeda dengan pemberian obat topikal komersial (*Neomycin sulfat* dan ekstrak plasenta) pada luka bakar terhadap penurunan jumlah sel makrofag pada hari ke-1, 3 dan 7.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pemberian salep kitosan yang dihasilkan dari bahan alami seperti ekstrak cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap luka bakar dengan lama waktu sehingga kesembuhan luka bisa sempurna.

DAFTAR PUSTAKA

- A. Barbul. 2005. *Wound Healing*. In: F. Charles Brunicardi, Dana K., Andersen, Timothy R., Billiar, David L., et al., eds. *Schwartz's principles of surgery*. 8th ed. New York: McGraw-Hill Companies.
- A. I. Suryadi., S. Maliawan., Asmarajaya. 2013. *Proses Penyembuhan dan Penanganan Luka*. Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
- A. Izzat., N. Dewi., Noviana. 2014. *Ekstrakharuan (Channa striata) secara Efektif Menurunkan Jumlah Limfosit Fase Inflamasi dalam Penyembuhan Luka*. Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat.
- A. L. Goeser. 2008. *Kulit, Rambut dan Kuku*. Raylene M Rospond.(8) : 265-271
- A. M. Djamaludin. 2009. *Pemanfaatan Khitosan dari Limbah Krustasea Untuk Penyembuhan Luka pada Mencit (Mus musculus albinus)*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- A. N. I. S. Ester., S. Troef. 2012. Pengaruh Pemberian Low-Level Laser Therapy pada Proses Penembuhan Luka Bakar Derajat II. Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- A. Tifani., R. Andina., D. Muhammad. 2015. *Efektivitas Pemberian Gel Binahong (Anredera Cordifolia) 5% Terhadap Jumlah Sel Fibroblast Pada Soket Pasca Pencabutan Gigi Marmut (Cavia Cobaya)*. Fakultas Kedokteran Gigi Unissula Semarang.
- AVMA, 2013. *Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*. AVMA.org
- B. Hastuti., N. Tulus. 2015. *Sintesis Kitosan dari Cangkang Kerang Bulu (Anadara Inflata) Sebagai Absorben Ion CU2+*. ISBN: 978-602-73159-0-7.
- B. P. Febram., I. Wientarsih., B. Pontco. 2010. Aktivitas Sediaan Salep Ekstrak Batang Pohon Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var *sapientum*) dalam Proses Persembuhan Luka pada Mencit (*Mus musculus albinus*). *Majalah Obat Tradisional*. 15(3): 121-137
- B. P. Nagori., R. Solanki. 2011. Role of Medicinal Plants in Wound Healling. *Research Journal of Medicinal Plants*. 5(4) : 392.
- D. S. Perdanakusuma. 2007. *Anatomi Fisiologi Kulit dan Penyembuhan Luka*. Surabaya. 1-8.
- E. Prianto. 2007. Peran Kepiting sebagai Spesies Kunci (Keystone Spesies) pada Ekosistem Mangrove. *Prosiding Forum Perairan Umum Indonesia IV*.

- F. Nazir., A. Zahari., E. Anas. 2015. Pengaruh Pemberian Gel Lidah Buaya (*Aloe vera*) Terhadap Jarak Pinggir Luka pada Tikus Wistar. *Jurnal Kesehatan Andalas* 4(3): 827.
- F. R. Putri., T. Sri. 2012. Efektivitas Salep Kitosan terhadap Penyembuhan Luka Bakar Kimia pada *Rattus novergicus*. *Jurnal fakultas kedokteran dan kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta* Vol 12, Yogyakarta.
- G. Argamula. 2008. Aktivitas Sediaan Salep Ekstrak Batang Pohon Pisang Ambon (*Musa paradisiaca*) Var Sapiantum dalam Proses Persembuhan Luka pada Mencit (*Mus musculus albinus*). Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor
- G. J. Marg., L. P. Kamolz., and S. Shahrokhi. 2013. *Burn Care and Treatment. A paertical Guide*. Springer. Canada. 14-20.
- H. Muliani. 2011. Pertumbuhan Mencit (*Mus musculus L*) Setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas L*). Jurusan Biologi F. MIPA UNDIP. Semarang. Buletin Anatomi dan Fisiologi Vol. XIX, No. 1, Maret 2011.
- H. P. Lorentz., M. T. Longaker. 2016. *Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment in Mathes Plastic Surgery*. Saunders Elsevier Philadelphia.
- I. P. R. Sabirin., Ani Melani Maskoen, S. Bethy., Hernowo. 2013. Peran Ekstrak Etanol Topikal Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) pada Penyembuhan Luka Ditinjau dari Imunoekspresi CD34 dan Kolagen pada Tikus Galur Wistar. *Jurnal Fakultas Kedokteran Gigi*, 45(5) : 227.
- J. A. Ramos-Vara. 2005. *Technical Aspects Of Immunohistochemistry*. Vet. Pathol. Vol 42 :405-426.
- M. Azhar., J. Efendi., E. Syofyeni., R. Marta., dan S. Novalina. 2010. Pengaruh Konsentrasi NaOH dan KOH terhadap Derajat Deasetilasi Kitin dari Limbah Kulit Udang. *EKSAKTA Vol. 1 Tahun XI*.
- M. Chanif. 2012. *Metode Penelitian dan Statistika*. Fakultas MIPA : UB Press.
- M. F. P. Firdaus., N. S. Madyawati., M. Widjaja., K. Lamid., S. H. Rachmawati., Warsito. 2013. Efektifitas Penambahan Kombinasi Tujuh Enzim Terhadap Estimasi Pertumbuhan Berat Badan Sapi Potong Peranakan Simental. *Jurnal Agroveteriner*. 2(1):3.
- M. J. Morison. 2004. Manajemen Luka. EGC. Jakarta.
- M. R. Akhoondinasab., M. Akhoonndinasab., M. Saberi. 2014 *Comparison of Healing Effeect of Aloe vera Extract and Silver Sulfadiazine in Burn Injuries in Experimental Rat Model*. Original article Vol. 3 No. 1
- MIMS. 2017. Bioplacenton. *MIMS [Online Journal]*. Tersedia dari; <http://www.mims.com/indonesia/drug/info/bioplacenton>.
- Moenadjat. 2003. *Luka Bakar Pengetahuan Klinis Praktis* (2nd ed.) p:1-82 Jakarta:Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

- MSN. Suriadi. 2007. *Manajemen Luka*. Pontianak. Stikep Muhammadiyah.
- N. Fitriani,. 2016. Uji Aktivitas Gel Etil P-Metoksisinamat Terhadap Penyembuhan Luka Terbuka Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Sprague Dawley [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan IUN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- O. H. Naibaho., V.Y.Y Paulina., W. Weny. 2013. *Pengaruh Basis Salep Terhadap Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Daun Kemangi (*Omicum sanctum L.*) pada Kulit Punggung Kelinci yang Dibuak Infeksi *Staphylococcus aureus**. Jurnal Ilmiah Farmasi Unstrat: 2(02). New York : Academy Press.
- Purnama., Handi., Sriwidodo., dan Soraya Ratnawulan. 2015. Review Sistematis: Proses Penyembuhan Dan Perawatan Luka. *Jurnal Fakultas Farmasi*, 15(2) : 251.
- R. Murray., V. Rajan. 2008. The duplicitous Nature of Inflammation in Wound Repair Wound practice and research.
- R. Syamsuhidayat., W. De Jong. 2005. *Buku Ajar Ilmu Bedah* (2nd ed.). Jakarta: EGC, 73-81.
- S. C. Smeltzer., B.G. Bare., J.L. Hinkle, K.H. Cheever. 2010. *Medical surgical Nursing*. 12th edition. Philadelphia: Lippincott William Wilkins.
- S. Juwana., Kasijan Romimohtarto. 2000, *Rajungan Perikanan, Cara Budidaya dan Menu Masakan*. Djambatan, Jakarta.
- S. Sukma., Sri Eva Lusiana., Masruri., dan Suratmo. 2014. Kitosan Dari Rajungan Lokal Portunus Pelagicus Asal Probolinggo, Indonesia. *Jurnal Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 2(2) : 506-507.
- Sirois. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier: USA.
- Sularsih. 2011. *Penggunaan Kitosan dalam Proses Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi Rattus Norvegicus*. Tesis. Universitas Airlangga Surabaya. h42-48.
- Suriadi. 2004. *Perawatan Luka Edisi I*. Jakarta: CV Sagung Seto.
- U. Balqis., Rasmaidar., Marwiyah. 2014. Gambaran Histopatologi Penyembuhan Luka Bakar Menggunakan Daun Kedondong (*Spondias dulcis f.*) dan Minyak Kelapa pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Medika Veterineria* 8(1): 31-36.
- V. Rajan., R. Murray. 2008. The duplicitous Nature of Inflammation in Wound Repair Wound practice and research.
- V. T. I. P. Tanggo. 2013. Pengaruh Pemberian Topikal Ekstrak Kulit Delima pada Penyembuhan Luka *Split Thicknes* Kulit Tikus. *Thesis*. Departemen/ SMF Ilmu Bedah Plastik Rekrotruksi dan Estetik. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga: Surabaya.

- W. J. Bacha., L. M. Wood. 2000. *Color Atlas of Veterinary Histology (2nd edition)*. Lippincott, Williams & Wilkins Publisher, Philadelphia, Pennsylvania,
- W. Paul., C. P. Sharma. 2004. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. *Trends Biomater. Artif. Organs*.
- W. Rachmawati., D. H. Husniati. 2012. *Produksi Kitosan dari Bahan Baku Cangkang Udang Menggunakan Metode Kimia dan Enzimatis dengan Enzim Kitin Deasetilase. Skripsi*. Universitas Lampung.
- Y. Anggraeni. 2012. *Preparasi dan Karakterisasi Film Sambung Silang Kitosan-Tripolifosfat yang Mengandung Asiatikosida sebagai Pembalut bioaktif untuk Luka* [Skripsi]. Depok. Universitas Indonesia.
- Y. F. Muskar. 2007. *Pedoman Teknis Budidaya Kepiting di Tambak*. Fakultas Perikanan Universitas Hasanudin: Makassar
- Y. Moenadjat. 2009. *Luka Bakar: Masalah dan Tatalaksana*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.

